

Universidad Complutense de Madrid

Facultad Ciencias Biológicas



**APORTACIÓN AL DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR  
*HELICOBACTER PYLORI***

**TERESA ALARCÓN CAVERO**

Madrid 1995

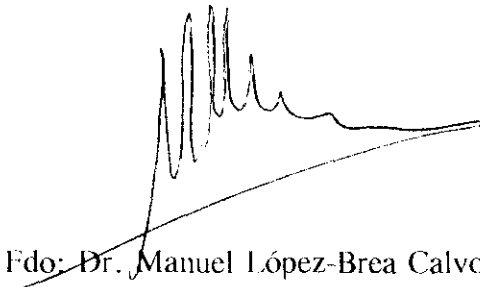
Director: Manuel López-Brea

MANUEL LÓPEZ-BREA CALVO, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital de la Princesa y Profesor asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "**APORTACIÓN AL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR *HELICOBACTER PYLORI***", realizada por Teresa Alarcón Cavero para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos suficientes para su lectura y defensa.

Y para que así conste, firmo el presente en Madrid a 27 de Noviembre de mil novecientos noventa y cinco.



Fdo: Dr. Manuel López-Brea Calvo

A mis padres.

## AGRADECIMIENTOS

---

Durante 4 años aproximadamente, estuve trabajando en un proyecto sobre Efecto Post-Antibiótico en patógenos respiratorios y, había comenzado a escribir mi Tesis Doctoral sobre ese tema. Sin embargo, mi interés sobre la infección producida por *H. pylori* era cada vez más creciente y había empezado a plantearme la posibilidad de cambiar el tema de mi Tesis Doctoral. El día 23 de Septiembre de 1993 en Bruselas, durante el VI Workshop on Gastroduodenal Pathology and *Helicobacter pylori*, tuve la inmensa suerte de asistir a una cena con los doctores: Martin Skirrow, Barry Marshall, Guillermo Pérez-Pérez, Manuel López-Brea y M<sup>a</sup> José Moreno. El Dr. Manuel López-Brea insistió para que el Dr. Barry Marshall nos contara la historia de *H. pylori*, cómo observaban el microorganismo en la tinción de Gram, cómo consiguió el primer cultivo el día 14 de Abril de 1982, después de unas vacaciones de Semana Santa, y cómo obtenían resultados positivos con la prueba de la ureasa. Creo que aquella noche descubrí a *Helicobacter pylori* y la emoción de trabajar con él y fue el día decisivo para que haya realizado esta tesis sobre un microorganismo tan fascinante. Pienso que es una de las situaciones que no se olvidan fácilmente y que te marcan de manera importante en tu historia científica. Por ello quiero dar las gracias al Dr. Barry Marshall, al Dr. Martin Skirrow, al Dr. Guillermo Pérez-Pérez y, por supuesto, al Dr. Manuel López-Brea que me han estimulado con sus conocimientos y su trabajo.

Quiero agradecer, también, al Dr. Manuel López-Brea, su apoyo, su confianza y su insistencia en la realización de este trabajo, especialmente en los momentos difíciles, y por su gran entusiasmo y fe en *H. pylori*, que transmite y contagia a las personas que tenemos la suerte de trabajar con él.



## AGRADECIMIENTOS

---

Esta tesis ha podido realizarse gracias a un trabajo de equipo, donde cada uno pone su granito de arena para que todo salga lo mejor posible. Por eso quiero agradecer de forma muy especial al equipo actual: Manuel López-Brea, Juan Carlos Sanz, M<sup>a</sup> Josefa Martínez, Diego Domingo, Isabel Sánchez, con los que he compartido, y comparto, mi entusiasmo, mi esfuerzo, mi ilusión, la alegría de cada cosa pequeña que sale bien y el ánimo cuando las cosas no salen tan bien.

Mi agradecimiento a las personas que, sin trabajar de forma habitual en el tema de *H. pylori* han colaborado de una forma o de otra, en la realización de alguna de las técnicas desarrolladas en esta Tesis: Susana de Pedro, en el estudio de las características bioquímicas del microorganismo, Laura Cardenoso, de gran ayuda en el manejo de los cultivos celulares. Así como a las personas que trabajaron con *H. pylori* en este Departamento, y que actualmente no se dedican a este tema: M<sup>o</sup> José Moreno, Elena Martín, Carmen López-Lavid.

A los residentes, becarios y personal facultativo del Servicio de Microbiología por su apoyo y colaboración.

Al personal técnico y administrativo del Servicio de Microbiología que ha colaborado con paciencia en la realización de este trabajo, y con los que he compartido tantos momentos agradables.

Al personal del Servicio de Microbiología de la Facultad de Biológicas, especialmente a Josefina Rodríguez de Lecea, por su ayuda.

A mis hermanos, amigos y todos los que de una o de otra forma han colaborado en la realización de esta tesis, de manera muy especial a mi hermana, M<sup>a</sup> Luisa Alarcón, por su gran ayuda.

## AGRADECIMIENTOS

---

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, que ha colaborado en diversos proyectos de investigación realizados en el Servicio de Microbiología (91/0203, 92/0388, 93/114, 95/222), sobre *H. pylori*.

Quiero agradecer a todas las personas que lean esta tesis doctoral su paciencia y su buena voluntad, y quiero pedir disculpas por los errores que puedan existir, a pesar de mi esfuerzo (las posibles faltas ortográficas, gramaticales, y de incorrecta utilización del español).

Y, por último, agradezco a mis padres todo lo que me han dado, sobre todo la educación y su ejemplo, con el que me han enseñado la satisfacción del deber cumplido y de las cosas bien hechas, la responsabilidad en el trabajo, y el esfuerzo infatigable para conseguir la meta.

---

## ÍNDICE

## Índice

---

1. INTRODUCCIÓN . . . . .	1
1.1 HISTORIA . . . . .	2
1.2 TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>HELICOBACTER</i> . . . . .	6
1.3 IMPLICACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i> EN ADULTOS . . . . .	9
1.3.1 GASTRITIS CRÓNICA . . . . .	10
1.3.2 GASTRITIS ASINTOMÁTICA . . . . .	10
1.3.3 DISPEPSIA NO ULCEROSA . . . . .	11
1.3.4 ÚLCERA DUODENAL . . . . .	11
1.3.5 ÚLCERA GÁSTRICA . . . . .	12
1.3.6 CÁNCER GÁSTRICO . . . . .	12
1.3.7 LINFOMA . . . . .	13
1.4 IMPLICACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i> EN NIÑOS . . . . .	14
1.4.1 GASTRITIS . . . . .	14
1.4.2 ÚLCERA DUODENAL . . . . .	15
1.4.3 ÚLCERA GÁSTRICA . . . . .	15
1.4.4 LINFOMA . . . . .	15
1.5 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i> . . . . .	16
1.6 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i> . . . . .	20
1.6.1. MÉTODOS INVASIVOS . . . . .	21
1.6.1.1 UREASA RÁPIDA . . . . .	21
1.6.1.2 TINCIONES HISTOLÓGICAS . . . . .	22

## Índice

---

1.6.1.3	CULTIVO . . . . .	23
1.6.1.4	TÉCNICAS MOLECULARES . . . . .	28
1.6.2.	MÉTODOS NO INVASIVOS . . . . .	32
1.6.2.1	ESTUDIO SEROLÓGICO . . . . .	32
1.6.2.2	PRUEBA DEL ALIENTO . . . . .	34
1.6.2.3	TÉCNICAS MOLECULARES . . . . .	35
1.7	CARACTERÍSTICAS DE <i>H. pylori</i> . . . . .	37
1.7.1	IDENTIFICACIÓN . . . . .	40
1.7.2	REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES . . . . .	42
1.7.3	FACTORES DE PATOGENICIDAD . . . . .	43
1.8	MÉTODOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS PARA DIFERENCIAR CEPAS . . . . .	53
1.8.1	Antibiotipado. . . . .	53
1.8.2	Biotipado. . . . .	53
1.8.3	Serotipado . . . . .	54
1.8.4	Estudios de proteínas . . . . .	54
1.8.5	Estudio de ADN plasmídico . . . . .	56
1.8.6	Estudio de ADN cromosómico . . . . .	58
1.8.6.1	Análisis con endonucleasas de restricción . . . . .	58
1.8.6.2	Electroforesis en campos pulsados . . . . .	59
1.8.6.3	Hibridación . . . . .	60
1.8.7	Métodos de tipado basados en RCP . . . . .	61
1.8.7.1	Amplificación específica y digestión con enzimas	

## Índice

---

de restricción . . . . .	61
1.8.7.2 Amplificación inespecífica . . . . .	62
1.9 ACTIVIDAD "in vitro" . . . . .	63
1.10 DESARROLLO DE RESISTENCIA . . . . .	67
1.11 TRATAMIENTO . . . . .	69
1.12 DESARROLLO DE UNA VACUNA . . . . .	70
2. OBJETIVOS . . . . .	73
3. MATERIALES Y MÉTODOS . . . . .	75
3.1 PACIENTES Y AISLAMIENTOS ESTUDIADOS . . . . .	76
3.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO HABITUALES . . . . .	78
3.2.1 ESTUDIO HISTOLÓGICO . . . . .	78
3.2.2 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO . . . . .	78
3.2.2.1 TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS . . . . .	78
3.2.2.2 PROCESAMIENTO DE LAS BIOPSIAS . . . . .	78
3.2.2.3 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN . . . . .	79
3.2.2.4 CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS . . . . .	79
3.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULARES . . . . .	80
3.3.1 METODOLOGÍA EMPLEADA . . . . .	80
3.3.1.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL ADN . . . . .	80
3.3.1.2 MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN . . . . .	81
3.3.1.3 LECTURA DE RESULTADOS . . . . .	86
3.3.2 COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS . . . . .	86

## Índice

---

3.3.3 RCP A PARTIR DE COLONIAS AISLADAS . . . . .	86
3.3.4 RCP A PARTIR DE BIOPSIAS . . . . .	88
3.4 CARACTERÍSTICAS DE <i>H. pylori</i> . . . . .	91
3.4.1 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD . . . . .	95
3.4.1.1 ANTIBIÓTICOS ESTUDIADOS . . . . .	95
3.4.1.2 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR . . . . .	95
3.4.1.3 PUNTO DE CORTE DE RESISTENCIA . . . . .	96
3.4.1.4 MÉTODO DE DIFUSIÓN CON DISCO . . . . .	97
3.4.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS . . . . .	98
3.4.2.1 ENZIMAS PARA DIAGNÓSTICO . . . . .	98
3.4.2.2 ENZIMAS PREFORMADAS . . . . .	98
3.4.3 CARACTERÍSTICAS DE VIRULENCIA . . . . .	99
3.4.3.1 MOVILIDAD . . . . .	99
3.4.3.2 EFECTO VACUOLIZANTE . . . . .	99
3.4.3.3 DETECCIÓN DEL GEN <i>cagA</i> . . . . .	100
3.5 MÉTODOS DE TIPADO FENOTÍPICO . . . . .	101
3.6 MÉTODOS DE TIPADO GENOTÍPICO . . . . .	102
3.6.1 ESTUDIO DE PLÁSMIDOS . . . . .	102
3.6.2 ESTUDIO DEL ADN TOTAL CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN . . . . .	103
3.6.3 RCP CON INICIADORES ARBITRARIOS . . . . .	103
3.6.4 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN SOBRE FRAGMENTO AMPLIFICADO . . . . .	105

## Índice

---

3.7	ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS DE TIPADO . . . . .	109
3.8	VALORACIÓN COSTE/BENEFICIO DE LOS MÉTODOS DE TIPADO . . . . .	110
3.8.1	PRESUPUESTO DE LOS MÉTODOS DE TIPADO . . . . .	111
3.8.2	GASTO (EN TIEMPO) DE PERSONAL TÉCNICO O FACULTATIVO . . . . .	118
3.8.3	TIEMPO NECESARIO PARA LA OBTENCIÓN DE RESULTADOS . . . . .	118
4.	RESULTADOS . . . . .	119
4.1	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR <i>H.</i> <i>pylori</i> . . . . .	120
4.1.1	COMPARACIÓN DE INICIADORES . . . . .	120
4.1.2	RCP A PARTIR DE COLONIAS . . . . .	123
4.1.3	RCP A PARTIR DE BIOPSIAS . . . . .	123
4.1.4	COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS . . . . .	129
4.2	CARACTERÍSTICAS DE <i>H. pylori</i> . . . . .	132
4.2.1	CARACTERÍSTICAS DE SENSIBILIDAD . . . . .	135
4.2.2	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS . . . . .	136
4.2.3	CARACTERÍSTICAS DE VIRULENCIA . . . . .	137
4.2.3.1	MOVILIDAD . . . . .	137
4.2.3.2	TOXICIDAD Y GEN <i>cagA</i> . . . . .	139
4.3	MÉTODOS DE TIPADO FENOTÍPICO . . . . .	142



## Índice

---

4.3.1 ANTIBIOTIPO . . . . .	142
4.3.2 BIOTIPO . . . . .	143
4.4 MÉTODOS DE TIPADO GENOTÍPICO . . . . .	146
4.4.1 ESTUDIO DE PLÁSMIDOS . . . . .	146
4.4.2 ESTUDIO ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN . . . . .	149
4.4.3 RCP CON INICIADORES ARBITRARIOS (RCP-IA) . . . . .	153
4.4.4 FRAGMENTO AMPLIFICADO DIGERIDO CON ER (ER- <i>ureB</i> ) . . . . .	158
4.5 COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE TIPADO . . . . .	163
4.5.1 TIPABILIDAD . . . . .	163
4.5.2 REPRODUCIBILIDAD . . . . .	164
4.5.3 PODER DISCRIMINATORIO . . . . .	166
4.6 ESTUDIO COSTE/BENEFICIO DE LOS METODOS DE TIPADO . . . . .	168
4.6.1 PRESUPUESTO ECONÓMICO DE CADA MÉTODO . . . . .	168
4.6.2 TIEMPO INVERTIDO POR EL PERSONAL . . . . .	170
4.6.3 TIEMPO NECESARIO PARA OBTENER EL RESULTADO . . . . .	171
4.6.4 RESULTADOS FINALES . . . . .	172
5. DISCUSIÓN . . . . .	173
5.1 DIAGNÓSTICO . . . . .	174
5.1.1 ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA RCP . . . . .	174

## Índice

---

5.1.2 SENSIBILIDAD DE LA RCP . . . . .	175
5.1.3 COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES MÉTODOS . . . . .	177
5.1.3.1 RCP POSITIVA Y MÉTODOS DE REFERENCIA NEGATIVOS . . . . .	177
5.1.3.2 RCP NEGATIVO Y MÉTODOS DE REFERENCIA POSITIVOS . . . . .	178
5.1.3.3 SENSIBILIDAD DEL CULTIVO . . . . .	179
5.2 CARACTERÍSTICAS DE <i>H. pylori</i> . . . . .	181
5.2.1 SENSIBILIDAD . . . . .	181
5.2.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS . . . . .	182
5.2.3 CARACTERÍSTICAS DE VIRULENCIA . . . . .	183
5.3 TIPADO FENOTÍPICO . . . . .	186
5.4 TIPADO GENOTÍPICO . . . . .	187
5.4.1 PLÁSMIDOS . . . . .	188
5.4.2 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN . . . . .	189
5.4.3 RCP-IA . . . . .	191
5.4.4 ER- <i>ureB</i> . . . . .	192
5.5 COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE TIPADO . . . . .	194
5.6 VALORACIÓN COSTE/BENEFICIO . . . . .	197
6. CONCLUSIONES . . . . .	198
7. BIBLIOGRAFIA . . . . .	202

---

## ABREVIATURAS

A	Muestra obtenida antes del tratamiento
AB	Antibiotipo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMX	Amoxicilina
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
B1	Muestra obtenida un mes después de terminar el tratamiento
B6	Muestra obtenida 6 meses después de terminar el tratamiento
B12	Muestra obtenida 12 meses después de terminar el tratamiento
B18	Muestra obtenida 18 meses después de terminar el tratamiento
BIOP	Biopsia
$\beta$ -glo	$\beta$ -globina humana
BHf	Infusión Cerebro-Corazón
BT	Biotipo
BrEt	Bromuro de etidio
C	Contaminado
<i>cagA</i>	Gen asociado a producción de citotoxina (Cytotoxin associated gen)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMI <sub>50</sub>	La CMI para el 50% de las cepas probadas
CMI <sub>90</sub>	La CMI para el 90% de las cepas probadas
CLA	Claritromicina
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil amonio
CULT	Cultivo

---

dNTP	Desoxinucleotidos trifosfato
DNU	Dispepsia no ulcerosa
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EL	Esterasa Lipasa
Enz.Pref.	Enzimas preformadas
ER	Enzimas de restricción
ER- <i>ureB</i>	Digestión con enzimas del fragmento amplificado del gen <i>ureB</i>
FAC	Fosfatasa ácida
FAL	Fosfatasa alcalina
HIST	Histología
ID	Indice discriminatorio
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
LA	Leucina arilamidasa
MALT	"Mucosa associated Lymphoid tissue"
MET	Metronidazol
mov	Movilidad
NCCLS	"National Committee for Clinical Laboratory Standard"
NCTC	"National Culture Type Colection"
ND	No determinado
NF	Naftol fosfohidrolasa

---

PFGE	Electroforesis en campos pulsados
PL	Plásmidos
PM	Peso Molecular
RCP	Reacción en cadena de la Polimerasa
RCP-IA	RCP con iniciadores arbitrarios
REF	Método de referencia
ER	Enzimas de restricción
RT-RCP	RCP con transcriptasa inversa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Gel de SDS-poliacrilamida
sp	Subpoblación resistente a metronidazol
TBE	Tampón tris/ácido bórico/EDTA
TE	Tampón Tris/EDTA
Tratto	Fase del tratamiento
TSB	Caldo Trypticase Soja
UB	Método de tipado mediante ER- <i>ureB</i>
UD	Úlcera duodenal
UG	Úlcera gástrica
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
<i>ureA</i>	Gen que codifica la sub-unidad A de la ureasa
<i>ureB</i>	Gen que codifica la sub-unidad B de la ureasa
UV	Luz ultra violeta
<i>vacA</i>	Gen que codifica para la proteína responsable del efecto vacuolizante.

## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 HISTORIA

En 1893, Bizzozero observó por primera vez microorganismos curvados y espirales en la mucosa de estómago de perros (Bizzozero 1893). Trabajos posteriores corroboraban la existencia de microorganismos espirales o "espiroquetas" en la capa de mucina de estómago de hombres y animales (Salomon 1896) y en pacientes con carcinoma gástrico (Kreintz 1906). En 1939, Doenges describió organismos con 2 ó 3 espirales en el 43% de 242 estómagos estudiados, pero no lo pudo relacionar con patología gástrica (Doenges 1939). En 1940, Freedberg y Barron demostraron microscópicamente la presencia de este tipo de bacterias en muestras de estómago de diferentes pacientes, relacionándolo con úlcera gástrica (Freedberg 1940).

Además de estas observaciones, se detectó ureasa en muestras de mucosa gástrica, aunque no asociada con la presencia de microorganismos. En 1950, Fitzgerald y Murphy estudiaron la ureasa gástrica en estómagos de personas con enfermedad ulcerosa péptica, sugiriendo que protegía la mucosa gástrica del ácido mediante la formación de amonio (Fitzgerald 1950).

El interés de estas observaciones descendió cuando, en 1954, Palmer estudió 1.000 biopsias de estómago y no encontró evidencia histológica de bacterias espirales en ninguna de ellas (Palmer 1954). Algunos años después, en 1975, Steer y col. estudiaron muestras de pacientes con úlcera gástrica, utilizando microscopio electrónico, y observaron la presencia de microorganismos con forma espiral, bajo la capa de moco y en la mucosa, asociados a una respuesta inflamatoria (Steer 1975).

El verdadero descubrimiento de estas bacterias se realizó en 1983, cuando Warren y Marshall publicaron los resultados de los trabajos que estaban realizando desde el principio de esa década. Observaron bacterias curvadas en la superficie de la mucosa antral humana, en un grupo de pacientes con gastritis crónica activa tipo B (Warren 1983, Marshall 1984 a). Marshall inoculó muestras de mucosa gástrica en los medios de cultivo habituales, incubó las placas durante 5 días (con motivo de unas vacaciones) y obtuvo por primera vez el cultivo de *H. pylori*. Desde entonces se ha podido comprobar que el cultivo de *H. pylori* es fácil si se consideran ciertas pautas, la más importante es mantener incubaciones prolongadas, mucho más largas de las que habitualmente se habían utilizado en los laboratorios de microbiología para el cultivo de cualquier bacteria patógena.

Estos microorganismos, Gram negativos, curvados, microaerófilos, se incluyeron dentro del género *Campylobacter* porque se parecían a los de este género, aunque Marshall y Warren no pudieron encontrar ninguna especie completamente similar a la bacteria que ellos habían aislado. El microorganismo es ureasa positivo, dato que no concordaba con ninguna especie del género *Campylobacter* descrita hasta ese momento, por lo que se pensó en un error en la metodología de trabajo. Posteriormente, se le identificó como una nueva especie, llamada de forma incorrecta: *Campylobacter pyloridis* (Marshall 1984 b), y poco después se le cambió el nombre por el de *Campylobacter pylori* (Marshall 1987 a). En 1989 se comprobó que no tenía las características del género *Campylobacter*, sino que era un nuevo género, y pasó a denominarse *Helicobacter pylori* (Goodwin 1989).



Desde que en 1984 se describió en Australia la asociación entre la infección por *H. pylori* y la gastritis, y se consiguió el aislamiento en medios de cultivo de esta bacteria, muchos grupos de investigadores en el mundo han intentado conocer la prevalencia, modo de transmisión y patogénesis de la gastritis asociada con *H. pylori*, como lo prueban los más de 3.000 artículos científicos publicados en el mundo sobre este tema, tanto en sus aspectos clínicos como microbiológicos.

Entre los hallazgos científicos más importantes y de mayor trascendencia, en poco más de 10 años de historia, se pueden encontrar:

1. Detección de numerosos factores de virulencia, que permiten un mejor conocimiento de la patogénesis y desarrollo de la enfermedad (Lee 1993).
2. Amplios conocimientos en la genética del microorganismo y en la secuenciación de la mayor parte de su genoma (Taylor 1992 a).
3. Cultivo de *H. pylori* a partir de heces, que favorecen la hipótesis de transmisión fecal-oral (Thomas 1992), y a partir de saliva y/o placa dentaria, sugiriéndose que la cavidad bucal actúa de reservorio para este microorganismo (Krajden 1989, Majmudar 1990) y permitiendo plantear hipótesis sobre la transmisión oral-oral del microorganismo.
4. Detección del microorganismo en muestras de agua y reservorios animales, que mejora el conocimiento de la epidemiología y de la forma de transmisión de esta bacteria (Fox 1995, Hultén 1995, Schauer 1995).

- 
5. Desarrollo de diferentes métodos de diagnóstico no invasivo que, aunque con limitaciones, permiten tener más datos de la epidemiología de la infección por este microorganismo y en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes después del tratamiento (Thomas 1994, Sanz 1994).
  6. Relación de este microorganismo como factor de riesgo importante en el desarrollo del cáncer gástrico (Eurogast Study Group 1993). Actualmente se le considera como un carcinógeno de clase I (Tytgat 1995).
  7. Asociación con linfomas tipo MALT (Wotherspoon 1991) y curación de los mismos, mediante la erradicación del microorganismo con tratamiento antibiótico (Hussell 1993, Stolte 1993).
  8. Aislamiento del microorganismo a partir de un hemocultivo, aunque sin encontrarse clara correlación con la patología del paciente (Ndawula 1994).
  9. Se han desarrollado algunos progresos intentando conseguir regímenes de erradicación cortos, con alta eficacia y pocos efectos secundarios (Labenz 1994), sin embargo, especialmente en países en desarrollo con alta prevalencia de la infección por *H. pylori*, la vacunación puede ser la respuesta final a esta epidemia (Michetti 1994).

## 1.2 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *HELICOBACTER*

*Helicobacter pylori* es un bacilo curvado o ligeramente espiral, Gram negativo, microaerófilico, aislado por primera vez en Australia (Marshall 1984 a) en pacientes con lesiones gástricas y úlcera péptica. Hace 12 años era una entidad poco menos que desconocida. Desde su descubrimiento se utilizaron diferentes nombres o siglas para referirse a esta nueva bacteria, hasta que en 1989, en el *International Journal of Systematic Bacteriology* (Goodwin 1989), recibió el nombre definitivo.

En un principio se le llamó CLO (Campylobacter-like organisms) o GCLO (Gastric Campylobacter-like organisms), ya que por su morfología espiral, su naturaleza microaerófila y su contenido en bases guanina + citosina (35,8-37,1 mol %), se asemejaban al resto de las especies del género *Campylobacter* (Marshall 1984 b). Después se le denominó *Campylobacter pyloridis*, comprobándose posteriormente que esta denominación era gramaticalmente incorrecta (el genitivo del latín "pilorus" es "pylori" y no "pyloridis") y se le sustituyó por *Campylobacter pylori* (Marshall 1987 a).

Cuando sus características y propiedades fueron estudiadas más ampliamente, se comprobó que existían numerosos criterios que indicaban que no era un *Campylobacter* propiamente dicho. Estudios fenotípicos sobre pruebas bioquímicas convencionales, perfiles proteicos y ácidos grasos celulares, y estudios genotípicos (ribotipado y secuenciación de ácidos nucleicos (Romaniuk 1987)), contribuyeron a su exclusión del género *Campylobacter* (Roope 1984). Se estudió su posible relación con

el género *Wolinella*, pero se diferenciaban fenotípicamente. Al microorganismo se le denominó *Helicobacter pylori*, como especie tipo de un nuevo género: *Helicobacter* (Goodwin 1989). La cepa tipo se aisló en el Royal Perth Hospital, lugar de trabajo de Marshall y Warren, los descubridores de esta bacteria (Marshall 1984 b), y actualmente es la cepa *Helicobacter pylori* ATCC 43504 y NCTC 11637. Se encuentra en la mucosa gástrica humana, y está implicado en la gastritis crónica activa tipo B. Es curvado en la mucosa gástrica pero puede no serlo "in vitro", posee de 4 a 6 flagelos en uno de los polos, necesita para crecer un 5-10 % CO<sub>2</sub>, no reduce los nitratos y tiene un contenido en G+C de 36 a 38mol% (Goodwin 1989).

Posteriormente, se aisló otro microorganismo en el estómago de hurones (Fox 1989) y se le llamó *Helicobacter mustelae* (Goodwin 1989), que posee cierta heterogeneidad genómica en relación con *H. pylori* (Morgan 1990).

Otras bacterias espirales y curvadas muy similares, si no idénticas, a *H. pylori* se han aislado de estómago de primates no humanos, incluyendo *Macaca nemestrina* (Bronsdon 1988), *Macaca mulatta* (Baskerville 1988 a), y de cerdo (Jones 1988). Todos estos microorganismos se asocian con el epitelio del estómago de gatos, perros, monos y ocasionalmente del hombre (Dent 1987, Dick 1989).

Se reconocen más de 10 especies dentro del género *Helicobacter* y géneros relacionados (Skirrow 1994), que incluyen:

Gástricos:

*H. pylori*. Aislado de estómago de hombre.

*H. heilmannii*. (anteriormente *Gastrospirillum hominis*). Observado en estómago de hombre (no cultivado hasta el momento).

*Gastrospirillum suis*. Observado en estómago de cerdo.

*H. felis*. Aislado de estómago de perros y gatos.

*H. mustelae*. Aislado de estómago de hurón.

*H. acinonyx*. Aislado de estómago de leopardo.

*H. nemestrinae*. Aislado de estómago de macacos.

Intestinales:

*H. cinaedi*. Aislado de intestino de hombre y hámster.

*H. fennelliae*. Aislado de intestino de hombre.

*H. muridarum*. Aislado de intestino de ratas y ratones.

*Flexispira rappini*. Aislado de intestino, hígado y estómago de hombre, oveja y perro.

*H. canis*. Aislado de intestino de perro.

Existen además otras especies que se van describiendo en diferentes huéspedes y probablemente se descubrirán muchas más en el futuro.

### 1.3 IMPLICACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori* EN ADULTOS

Desde que se relacionó por primera vez la presencia de *H. pylori* con la enfermedad gastroduodenal en humanos (Warren 1983), se han realizado numerosos estudios que confirman su asociación con gastritis, úlcera péptica, úlcera duodenal (Jones 1984, McNulty 1984, Rollanson 1984, López-brea 1985, Marshall 1985 a, Marshall 1990) y una posible causa de dispepsia no ulcerosa (McNulty 1990).

La infección por *H. pylori* es responsable de prácticamente todos los casos de gastritis crónica activa y duodenitis (Axon 1989); el microorganismo se encuentra en el 90% de las úlceras duodenales y aproximadamente en el 70-80% de las úlceras gástricas (Marshall 1994, Boixeda 1994); es un factor de riesgo importante en el desarrollo del cáncer gástrico (Cheng 1987, Jiang 1987, Parsonnet 1993), y un 90% de los linfomas tipo MALT están asociados con *H. pylori* (Isaacson 1992, Wotherspoon 1993) (linfoma tipo MALT = Mucosa-Associated Lymphoid Tissue). En contraste con estos datos, menos del 10% de adultos y niños con mucosa gástrica normal están colonizados con *H. pylori* (Morgan 1989).

Existen numerosos datos clínicos y microbiológicos que sustentan su poder patógeno, pero los mecanismos últimos por los que *H. pylori* coloniza, infecta y lesiona la mucosa gástrica no están todavía claramente establecidos (Buck 1990, Newell 1991). Se están realizando numerosos estudios en modelos "in vitro", y en mayor número en modelos animales, para intentar explicar el mecanismo de patogenicidad de este

microorganismo (Skirrow 1994, Workshop of the European *Helicobacter pylori* Study Group, Houston 1994).

Actualmente se considera que *H. pylori* está asociado con las siguientes enfermedades digestivas:

**1.3.1 GASTRITIS CRÓNICA:** Se ha sugerido como la principal causa de gastritis crónica. Esta consideración se ha realizado a) por la asociación entre infección y gastritis crónica en el 60-90% de los pacientes, b) por la ausencia casi total de *H. pylori* en formas autoinmunes de gastritis crónica y en mucosa gástrica normal, c) por la presencia de diferentes factores de virulencia en *H. pylori*, d) por el cumplimiento de los postulados de Koch (Marshall 1985 b, Morris 1987), e) por los diversos estudios experimentales realizados en animales y f) por la reducción de la actividad inflamatoria en la mucosa gástrica y la curación de las lesiones después de la supresión y/o erradicación de *H. pylori* con antimicrobianos. *H. pylori* está presente en la forma activa de la gastritis crónica y no en las formas inactivas, y se considera como un último estadio en la evolución de la gastritis.

**1.3.2 GASTRITIS ASINTOMÁTICA:** El riesgo de padecer cáncer de estómago en personas infectadas asintomáticas es del 0.5% en EEUU, pero podría ser más alto en países subdesarrollados (Parsonnet 1991). Actualmente no se recomienda la búsqueda y tratamiento de *H. pylori* en personas asintomáticas, pero quizá sí en grupos de riesgo (en pacientes con historia familiar de cáncer gástrico) (Marshall comunicación personal).

**1.3.3 DISPEPSIA NO ULCEROSA (DNU):** *H. pylori* es un factor potencial en la etiología de la dispepsia no ulcerosa. La prevalencia de infección por *H. pylori* en DNU es del 50 al 87%, aproximadamente un 20% más alto que en individuos normales de las mismas edades (Kang 1990). Sin embargo, la asociación entre *H. pylori* y DNU no es tan fuerte como en gastritis crónica o úlcera duodenal, debido en parte a la controversia en la definición de DNU. Diversos autores han intentado relacionar síntomas específicos de pacientes con DNU y *H. pylori*, pero no se han obtenido resultados concluyentes (Rathbone 1988, Sobala 1989). La mayoría de los estudios muestran que el tratamiento con sales de bismuto puede reducir los síntomas en pacientes con DNU si se erradica *H. pylori*. Un meta-análisis de estos ensayos clínicos ha confirmado que un tratamiento activo de la infección con aclaramiento de *H. pylori* mejora la sintomatología en DNU (Lamouliatte 1990). En el trabajo de O'Morain (Patchett 1991) se observó que los enfermos a los que se erradicó *H. pylori* mantuvieron la mejoría, mientras que recayeron la mayoría de los que permanecieron infectados con el microorganismo.

**1.3.4 ÚLCERA DUODENAL (UD):** La infección por *H. pylori* tiene su tasa de prevalencia más alta en pacientes con UD, en los que la infección antral excede el 90% (Graham 1989). El proceso por el que *H. pylori* contribuye al desarrollo de la úlcera es todavía hipotético, parece que produce duodenitis y predispone a la úlcera. El importante papel de *H. pylori* en la etiología de la UD está basado en el hecho de que, después de la erradicación del microorganismo, la tasa de recaída es significativamente más baja que después del tratamiento con bloqueantes de receptores de  $H_2$ , los cuales



no tienen efecto sobre *H. pylori*. Se ha demostrado que la tasa de recaída de la UD después de 1 año disminuye al erradicar *H. pylori* (Marshall 1988 a, Rauws 1990). Se han descrito porcentajes de curación del 90% de la UD (Hirschowitz 1994).

**1.3.5 ÚLCERA GÁSTRICA (UG):** La asociación entre *H. pylori* y UG es menor que la establecida con la UD y ocurre aproximadamente en el 60-70% de los casos (Ormand 1990): Esto puede explicarse por la alta incidencia de UG producida por anti-inflamatorios no esteroideos. Sin embargo, actualmente la asociación con UG se considera tan importante como con la úlcera duodenal, según los estudios llevados a cabo en japoneses de Hawái donde han encontrado una tasa similar en el riesgo de úlcera duodenal y gástrica y han confirmado que la gastritis precede a la ulceración (Nomura 1994).

**1.3.6 CÁNCER GÁSTRICO:** Existen dos tipos histológicos principales de cáncer gástrico: intestinal (que es el predominante) y difuso. La evolución histológica de la gastritis crónica y la observación epidemiológica de la infección por *H. pylori* sugieren que este microorganismo puede ser un factor de riesgo en la inducción del cáncer gástrico tipo intestinal (Malfertheiner 1992). La presencia de *H. pylori* aumenta 6 veces la probabilidad de desarrollarlo (Eurogast Study Group 1993).

La atención se encuentra centrada en la atrofia de la mucosa y la metaplasia intestinal como un factor de riesgo para la malignización. Un trabajo reciente indica que la gastritis crónica no-atrófica está asociada con un aumento en el riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico (Sipponen 1994 a, Sipponen 1994 b).

**1.3.7 LINFOMA:** El tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma tipo MALT = Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) puede experimentar un cambio malignizante. Un 90% de estos linfomas están asociados con *H. pylori* (Isaacson 1992). Los folículos linfoides disminuyen de manera importante después de un tratamiento efectivo frente a *H. pylori* (Wotherspoon 1991, Hussell 1993, Stolte 1993). En el futuro, es muy posible que el tratamiento de los linfomas gástricos comprobados o sospechados, asociados a *Helicobacter pylori*, se inicie con la erradicación del microorganismo.

## 1.4 IMPLICACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori* EN NIÑOS

El dolor abdominal recurrente se produce en un 10 a 15% de los niños en edad escolar (Lindberg 1994). Un tercio de los pacientes que acuden a endoscopia por este motivo están colonizados por *H. pylori* en el antro, y esta prevalencia es más alta que en niños asintomáticos de la misma edad (Oderda 1992). También está presente en niños con pérdida o no ganancia de peso, o incluso en niños con problemas de crecimiento (Benhamou 1994, Raymond 1994, Oderda 1995). Sin embargo, existe un estudio que indica que no hay diferencias significativas entre los síntomas en los niños colonizados con *H. pylori* y los no colonizados (Reifen 1992), y otro en el que se observa que los niños con serología positiva frente a *H. pylori* se encuentran a menudo asintomáticos (Fiedorek 1991).

**1.4.1 GASTRITIS.** La gastritis crónica en niños es normalmente primaria, está asociada con la colonización por *H. pylori* (Drumm 1987 a) y la erradicación del microorganismo ocasiona la curación de la misma (Drumm 1988 a, Oderda 1989 a). *H. pylori* está fuertemente asociado con la gastritis crónica antral en niños (Czinn 1986 a, Cadranet 1986, Hill 1986, Glassman 1989), aunque la colonización por *H. pylori* en el antro gástrico es menos común en niños que en adultos (Drumm 1990 a, Drumm 1990 b). Los hallazgos histológicos y morfológicos son a menudo diferentes en niños que en adultos (Drumm 1987 b, Kilbridge 1988, Hassal 1989). La incidencia de gastritis aumenta con la edad y depende de las condiciones socioeconómicas y del nivel de desarrollo del país. En el norte de Africa y en Tailandia, el 50% de los niños están

infectados en los primeros años de vida (Megraud 1989 a, Pérez-Pérez 1990), mientras que en los países desarrollados solamente el 5% lo están (Megraud 1989 a). La gastritis crónica asociada a *H. pylori* no se observa directamente en la endoscopia (Drumm 1987 b), por lo que debe obtenerse una muestra de mucosa gástrica en los niños con molestias del tracto gastrointestinal superior. Pueden observarse nódulos en la mucosa gástrica asociada con gastritis por *H. pylori* (Hassall 1989, Oderda 1989 b, De Giacomo 1990), hecho que no se ha informado en adultos.

**1.4.2 ÚLCERA DUODENAL.** Es menos frecuente en niños que en adultos (Murphy 1987) y, cuando se observa, puede ser primaria o secundaria (Drumm 1988 b). La úlcera duodenal secundaria está asociada con la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica (Kilbridge 1988, Hassall 1989, Drumm 1990 a).

No está claro cuál es el efecto de la erradicación de *H. pylori* en niños con úlcera duodenal, aunque parece que también favorece la curación de la misma. Sin embargo, el pequeño número de casos estudiados hace difícil su confirmación (Coughlan 1987, Yeung 1990).

**1.4.3 ÚLCERA GÁSTRICA.** La úlcera gástrica primaria es rara en niños, por lo que no ha sido posible estudiarla cuidadosamente (Gormally 1993).

**1.4.4 LINFOMA.** Se ha descrito 1 caso de linfoma gástrico, asociado con gastritis por *H. pylori* en un niño (Ashorn 1994).

### 1.5 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori*

*H. pylori* se ha detectado en pacientes de todo el mundo, en muestras de mucosa gástrica asociada a gastritis, pero también en casos de infección asintomática. Es necesario disponer de una prueba diagnóstica barata, segura, precisa y realmente útil, así como no invasiva, para poder definir la frecuencia de infecciones asintomáticas. Los estudios realizados han utilizado métodos de diagnóstico como serología y/o prueba del aliento (Barthel 1990, Ormand 1990).

La mayoría de los estudios realizados se basan en estudios de prevalencia, ya que los estudios de incidencia son difíciles de llevar a cabo. La incidencia se refiere al número de nuevos casos de infección en un período de tiempo y en una población específica (Last 1988). Esto no se puede determinar en el caso de la infección por *H. pylori*, ya que los síntomas de la infección son escasos e inespecíficos y, salvo casos excepcionales, no se conoce el curso agudo de la infección. Además es necesario realizar seguimiento a largo plazo de las personas no infectadas para poder identificar la incidencia.

La prevalencia se define como el número de casos infectados, presentes en una población, en un momento determinado (Last 1988), y puede demostrarse fácilmente con los métodos de diagnóstico disponibles. La prevalencia de la infección por *H. pylori* depende preferentemente de la edad, el estado socioeconómico y el grupo étnico.

En países desarrollados, la prevalencia de la infección por *H. pylori* parece más baja en niños y aumenta gradualmente con la edad (Rautelin 1991, Kotiainen 1994,

Blecker 1994). En un estudio realizado en Francia, el 4% de los niños de 9 años estaban infectados, el 16% de los jóvenes de 19 años, aumenta a un 25% en adultos de 20 a 29 años y alcanza un 35% en adultos de 50 a 59 años (Megraud 1989 a).

Sin embargo, en países no industrializados, es más habitual presentar una infección asintomática y los niños se encuentran frecuentemente colonizados por *H. pylori* (Sathar 1994, Oliveira 1994). Entre el 40 y 75% de las personas de 19 años se encuentran infectadas, y los adultos de 50 a 59 años se encuentran infectados en un 70 a 88% (Megraud 1989 a, Talley 1993). En cualquier caso, la tasa de prevalencia es mucho más alta que en países desarrollados (Megraud 1989 a, Pérez-Pérez 1990).

La edad en la que se adquiere la infección por *H. pylori* y, por lo tanto, la gastritis, va a tener importancia sobre la patología subsecuente (Goodwin 1993 a).

Existe una mayor frecuencia de la infección por *H. pylori* en determinados grupos étnicos (Dwyer 1988 a, Dwyer 1988 b, Graham 1988, Graham 1991, Dehesa 1991, Malaty 1992) y una fuerte relación con la condición socioeconómica y educacional (Malaty 1994). El contacto próximo y las condiciones sanitarias pobres puede aumentar el riesgo de contagio, así como el vivir en agrupamientos familiares (Drumm 1990 b, Webb 1994 a) o en instituciones cerradas (Berkowicz 1987, Pérez-Pérez 1990, Proujansky 1994, Quirós 1994), especialmente si hay mucha gente (Mendall 1992), incluso cuando las condiciones sanitarias son buenas (Vincent 1994).

La fuente y modo de transmisión no se conoce todavía. El principal reservorio encontrado hasta el momento es el estómago del hombre, por lo que la transmisión persona a persona, vía oral-oral o fecal-oral, parece la fuente de contagio más importante (Best 1994, Oderda 1995). *H. pylori* puede ser diseminado por contacto con

secreciones gástricas y se ha observado contagio en personal que trabaja realizando endoscopias (Mitchell 1989, Langenberg 1990). Se ha conseguido el cultivo de *H. pylori* a partir de heces (Thomas 1992, Kelly 1994), aunque ha sido difícil de confirmar por otros autores (Leverstein 1993), y en algunas ocasiones a partir de placa dental (Krajden 1989, Desai 1991) o de la saliva (Ferguson 1993), que tampoco ha sido reproducido por otros autores (Bernander 1993), indicando la dificultad que supone cultivarlo a partir de muestras contaminadas. Sin embargo, los hallazgos, aunque sean esporádicos, sugieren que *H. pylori* se encuentra refugiado en la cavidad bucal con una atmósfera húmeda y un ambiente reducido en oxígeno, aunque la importancia de esto en la transmisión del microorganismo en la población general es incierta. No existe evidencia de que pueda ocurrir transmisión sexual (Polish 1991) y se había pensado que los animales representaban una improbable fuente de infección (Morris 1986, Vaira 1988 a).

Recientemente se ha descrito la presencia de *H. pylori* en gatos domésticos, en los que se produce gastritis grave similar a la que ocurre en humanos (Handt 1994). Se ha detectado por cultivo en muestras de saliva, heces y jugo gástrico (Fox 1995), y ser propietario de gatos es un factor de riesgo para la infección por *H. pylori* (Veldhuyzen 1994). Se puede producir transmisión de *H. pylori* a partir de animales domésticos, como lo demuestra el hecho de existir una mayor prevalencia de la infección entre personal expuesto a contacto con animales que entre la población general (Thomas 1995), y porque en la infección por *Helicobacter heilmannii* los animales domésticos pueden actuar de reservorios (Thomson 1994, Stolte 1994, Mendes 1995, Hänenen 1995).

---

Se ha aislado el microorganismo a partir de un hemocultivo, aunque no se ha encontrado clara relación con la patología que sufría el paciente (Ndawula 1994), y por lo tanto no se conoce su implicación clínica.

Se ha observado que *H. pylori* sobrevive en agua del grifo algunos días en el laboratorio y permanece metabólicamente activo, como formas cocoides no cultivables, durante varios meses (Bode 1993). Se ha detectado mediante técnicas moleculares como RCP, en muestras de aguas fecales en Perú (Westblom 1993 a) y en diferentes muestras de agua utilizadas para consumo en Perú (Hulten 1995) y en Colombia (Schauer 1995).

Una vez que se adquiere la infección, se mantiene en los adultos durante años, décadas o incluso toda la vida. Sin embargo, la erradicación espontánea puede ocurrir en niños, según se ha demostrado en Perú (Klein 1994) y en Italia (Oderda 1994).



## 1.6 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori*

Para diagnosticar la infección producida por *H. pylori* se pueden realizar métodos directos, que detectan la presencia del microorganismo (cultivo, tinciones histológicas, técnicas moleculares) o indirectos, que estudian alguna característica de *H. pylori* (urea rápida, prueba del aliento con urea) o los anticuerpos producidos por el paciente (técnicas serológicas). Las muestras utilizadas para el diagnóstico pueden obtenerse por métodos invasivos (biopsia) o no invasivos (suero, saliva, etc) (Alpert 1989).

Los métodos considerados de referencia, para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, son los directos (cultivo o tinción), y el resto de los métodos que se utilicen deben ser comparados con éstos.

El cultivo de *H. pylori* a partir de biopsia es un procedimiento usado rutinariamente en muchos laboratorios del mundo, constituye el "gold standard" para identificación de *H. pylori* y es necesario para monitorizar la resistencia a los antimicrobianos, clasificar las cepas y estudiar factores de patogenicidad.

### **1.6.1. MÉTODOS INVASIVOS**

#### **1.6.1.1 UREASA RÁPIDA**

McNulty y Wise usaron por primera vez el método de introducir la biopsia gástrica en un caldo con urea de Christensen y observaron visualmente el cambio de color (McNulty 1985 a). Este método fue el primero desarrollado como diagnóstico rápido, que además tenía la ventaja de ser sencillo de realizar, y se basa en la capacidad que tiene este microorganismo de hidrolizar la urea produciendo amonio (Langenberg 1984). El amonio aumenta el pH del medio y se observa como un cambio de color del indicador de pH apropiado. Diversos investigadores han confirmado estos primeros resultados (Chodos 1988, Westblom 1988 a, Deltenre 1989, Simor 1990 a), proponiendo diferentes modificaciones para mejorar la prueba y hacerla más simple y más rápida, como aumentar el porcentaje de urea hasta el 6 ó 10% (originalmente era al 2%) (McNulty 1992), reducir el volumen del caldo o agar en el que se coloca la biopsia, modificar la temperatura de incubación desde 25°C hasta 55°C (Hazell 1987, Marshall 1987 b, Arvind 1988, Vaira 1988 b, Vaira 1988 c, McNulty 1989, Thillainayagaim 1991) o colocar la biopsia en un papel con urea, presionando entre dos cristales y observando el cambio de color en pocos minutos (Zhong 1990).

Estos métodos presentan una sensibilidad entre el 64 y el 98% y una especificidad entre el 98 y el 100%, según el método utilizado y comparándolos con el método de referencia (McNulty 1992, Mohamed 1994). La sensibilidad y especificidad es aceptable, y el método mucho más barato, rápido y fácil de realizar que los métodos de referencia, sin embargo tiene dos inconvenientes: es un método indirecto y no evita la endoscopia digestiva.

### 1.6.1.2 TINCIONES HISTOLÓGICAS

Warren recomendó la tinción de plata de Warthin-Starry en su informe original (Warren 1983). Es una tinción muy buena para visualizar los microorganismos, pero es cara, compleja, necesita mucho tiempo para realizarla y personal experimentado. En ocasiones puede ser difícil distinguir el microorganismo de precipitados de plata en la capa de "mucus" y, por lo tanto, se pueden dar resultados falsos positivos (Madam 1988). La tinción de Giemsa modificado es más consistente, menos costosa y más rápida, por lo que actualmente se considera la tinción de elección (Gray 1986, Madam 1988).

Se han propuesto otras tinciones para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, entre las que se encuentran: Brown-Hopps (Westblom 1988 b), Violeta rápida (Burnett 1987), Gram modificado (Trowell 1987), Giménez (McMullen 1987), fuchina (Rocha 1989), naranja de acridina (Chodos 1988), bromuro de etidio (López-Brea 1987), Wright modificado (Butler 1990), Diff-Quik (Skipper 1989), Papanicolau (Pinto 1991), toluidina O (Slater 1990) y la técnica de Wayson (Andreica 1990).

También se han propuesto técnicas inmunohistoquímicas (Engstrand 1988, Negrini 1989) e inmunofluorescentes, usando anticuerpos monoclonales frente a *H. pylori* (Husson 1991), para detectar el microorganismo a partir de material de biopsia reciente, secciones congeladas o tejidos fijados en formalina. Estas técnicas se consideran como métodos en investigación y no es probable que se extienda su uso como rutina por su coste y complejidad. Además, probablemente ofrece pocas ventajas sobre los métodos anteriores.

Los métodos histológicos e inmunohistoquímicos pueden ser sensibles y

específicos, pero no son rápidos. Para obtener resultados rápidos se puede usar microscopía directa del material de la biopsia, con tinción de Gram modificada. Se han publicado datos de sensibilidad de alrededor del 90% y especificidad próxima al 100% (Montgomery 1988, Parsonnet 1988, Morris 1989).

### 1.6.1.3 CULTIVO

Medio de cultivo: La selección de las condiciones apropiadas para el aislamiento y posterior cultivo de *H. pylori* depende en parte del equipo y de los medios disponibles, y de las preferencias del equipo investigador (Hazell 1993). Hay muchas citas bibliográficas donde se recogen las preferencias de cada autor con respecto al aislamiento de *H. pylori*; cada uno compara diferentes métodos y condiciones y saca sus conclusiones con respecto al mejor medio para el cultivo de este microorganismo. Aunque las preferencias de unos equipos no son siempre las mejores condiciones para otros (Krajden 1987, Parsonnet 1988, Coudron 1989, Tee 1991, Anssorg 1991, López-Brea 1992 a).

Entre los numerosos medios de cultivo sólido que se han utilizado para el aislamiento de *H. pylori*, se encuentran diferentes fórmulas de agar base, como Infusión Cerebro-Corazón (BHI), Columbia, Brucella, Mueller Hinton, etc (Buck 1987, Queiroz 1987, Dent 1988, Tee 1991). Estos medios se suplementan con sangre de carnero o caballo en un 5 al 10%, en la mayoría de los estudios publicados, aunque también se han usado otros suplementos como hemina o isovitalex (Goodwin 1985 a), carbón (Glupczynski 1988 a), yema de huevo (Westblom 1991 a), almidón (Buck 1987), ciclodextrina (Olivieri 1993), o suero de caballo.

Uno de los mayores problemas prácticos en el manejo de *H. pylori* es la contaminación con otros microorganismos o especialmente con hongos; por esta razón, se han utilizado medios de cultivo selectivos para el aislamiento primario a partir de las biopsias gástricas (Goodwin 1985 a, Krajden 1987), aunque algunos autores indican que los suplementos antibióticos del medio no son imprescindibles para el aislamiento de *H. pylori*, ya que se puede aislar del medio no selectivo a pesar de la contaminación. El uso de medio selectivo y no selectivo simultáneamente asegurará que no se pierda ni siquiera un pequeño número de cepas (Goodwin 1990, Hazell 1993). Se han propuesto diversos antibióticos para ser incluidos en el medio de cultivo, los más frecuente son cefsulodina, trimetoprim, vancomicina y anfotericina B (Dent 1988, Glupczynski 1988 a, Westblom 1991 a). También se ha utilizado ácido nalidíxico y polimixina (Goodwin 1985 a, Queiroz 1987), aunque actualmente no se recomienda porque el ácido nalidíxico puede inhibir hasta el 14% de las cepas de *H. pylori* y la polimixina puede inhibir el 5% (Dent 1988).

Número de biopsias. Los errores pueden disminuir si se toman 2 biopsias antrales y/o una biopsia adicional del cuerpo o del "fundus" del estómago. Las 2 muestras aumentan la sensibilidad del cultivo (Hazell 1987, Goodwin 1990). En un número de casos limitado, *H. pylori* se encontrará sólo en el cuerpo gástrico (Bayerdörffer 1989, Stolte 1990, Satoh 1991). Esta recomendación es clara para muestras de adultos, sin embargo, en niños, una biopsia parece ser suficiente (Gormally 1993).

Medio de transporte. *H. pylori* es extraordinariamente sensible a la desecación y a las condiciones atmosféricas, por lo que la forma de transporte al laboratorio es muy importante. Para evitar la desecación se podrían inocular las muestras directamente en el medio de cultivo (Hazell 1986), o transportar la biopsia sobre la pared de un tubo estéril con 1 ml de solución salina; este último método es válido para cortos períodos de tiempo (Morton 1995). Cuando se van a pasar varias horas desde que se obtiene la muestra hasta que se siembra, es necesario usar un medio de transporte, porque el microorganismo puede perder viabilidad (Goodwin 1989, West 1990). Se han utilizado distintos medios de transporte, como solución de glucosa al 20%, BHI con 1 % de suero ó 0.5 % albúmina de suero bovina y con 0.1 % de catalasa, y medio de Stuart con carbón (Hazell 1989, Kjölher 1991).

Para el transporte de los aislamientos de unos centros a otros, se han utilizado también diferentes condiciones y parece que agar chocolate, tanto en tubo en visel como en placa, dentro de una bolsa de microaerofilia, es adecuado para mantener la viabilidad al menos 4 días (Xia 1994 a).

Cultivo en medio líquido: Es necesario poder obtener cultivo en medio líquido para estudios de fisiología y metabolismo, y para conseguir inóculos elevados del microorganismo. Morgan y col. usaron caldo Brucella, como medio base, suplementado con 10% de suero fetal bovino y observaron que el crecimiento de *H. pylori* era adecuado (Morgan 1987 a). Después de una incubación de 72 h, el cultivo es capaz de aumentar el inóculo desde aproximadamente  $10^2$  UFC/ml hasta  $10^8$  UFC/ml. Sin embargo, Hawrylik y col. mostraron que cuando el caldo de Brucella no contenía

bisulfito o sulfito, se mejoraba el crecimiento de *H. pylori*, quizá porque la oxidación gradual de estos componentes, después de su exposición al aire, puede afectar al potencial redox del medio (Hawrylik 1994).

*H. pylori* se ha aislado a partir de la sangre de un paciente con linfoma, usando el sistema BACTEC NR 730 aeróbico (Ndawula 1994). El microorganismo no tenía, probablemente, un papel importante en la patogenia de la enfermedad, pero llamó la atención sobre la posibilidad de su aislamiento en hemocultivos. Posteriormente, se han realizado otros estudios para conocer si es posible aislarlo en los diferentes sistemas y/o medios utilizados para cultivo de sangre (Kehler 1994).

Atmósfera de incubación. La incubación de los organismos debe hacerse en atmósfera microaerofílica con 5 a 7 % de Oxígeno, pues no crecen aeróbicamente, y si los aislamientos permanecen a temperatura ambiente más de 45 minutos pueden dejar de ser viables. La atmósfera microaerofílica puede obtenerse incubando las muestras en una estufa con 5 % de CO<sub>2</sub>, en jarra de anaerobios con catalizador de paladio y un sobre de CAMPY-PACK (Becton Dickinson), en jarra de anaerobios con sobre GAS-PACK (Becton Dickinson) y sin catalizador de paladio o en cabinas de atmósfera variable, y en todos los casos la humedad relativa debe ser elevada.

Algunos autores opinan que una estufa de CO<sub>2</sub> es válida para subcultivar pero que algunos aislamientos primarios no van a crecer en este ambiente (Goodwin 1990, Goodwin 1985 a). Otros autores, sin embargo, indican que este microorganismo puede perder viabilidad en las jarras de microaerofilia, porque los sobres generadores de gas pueden producir un ambiente gaseoso subóptimo, y el uso de una estufa de CO<sub>2</sub> con una

humedad relativa del 98% puede ser más adecuado (Hazell 1993).

Algunos trabajos recientes indican que el crecimiento óptimo de *H. pylori* se obtiene con una presión parcial de Oxígeno de 2-10 kDa (Kangatharalingam 1994). Xia y col. encuentran que la mayoría de sus aislamientos son capaces de crecer en medio aeróbico, aunque se reduce el número y el tamaño de las colonias que se aíslan (Xia 1994 b).

Período de incubación. El período mínimo de incubación es de 2 días, para cultivo secundario de microorganismos ya aislados, y de 4 ó 5 días para aislamiento primario, pudiendo necesitar hasta 10 a 15 días para obtener crecimiento positivo a partir de muestras de biopsia, en casos especiales (Tytgat 1991).

Conservación de los aislamientos: Para mantener los aislamientos durante largos períodos de tiempo (más de 6 meses), debe introducirse la mayor cantidad de microorganismos vivos en un vial que contenga un medio base y 15 a 20% de glicerol. Se ha utilizado conservación en congelador de -70°C o en nitrógeno líquido (Shahamar 1992). Anssorg recomienda la conservación de aislamientos recientes de *H. pylori* a -70°C en solución de mucina al 10% (Anssorg 1991).



#### 1.6.1.4 TÉCNICAS MOLECULARES

Se están desarrollando diferentes métodos moleculares para diagnosticar la infección por *H. pylori*; sin embargo, hasta el momento, se consideran técnicas de investigación porque se necesita experiencia técnica y un equipo sofisticado, que no está disponible en muchos laboratorios de diagnóstico.

La necesidad de equipos complejos puede ser un inconveniente si el laboratorio no dispone de ellos, pero presenta la gran ventaja de que no necesita que la bacteria esté viva, por lo que puede permitir el traslado de las muestras de unos laboratorios a otros sin que los resultados se vean alterados.

Se han desarrollado métodos moleculares aplicados a muestras de biopsia gástrica para detectar la presencia de *H. pylori*. En primer lugar, se aplicaron técnicas de hibridación con sondas marcadas radiactiva o antigénicamente, hibridación con oligonucleótidos basados en secuencias de ARNr y métodos de hibridación "in situ" con sondas de ADN específicas para *H. pylori*, tanto con marcaje radiactivo (Morotomi 1989), como con marcaje no radiactivo (Van den Berg 1989). Estos métodos permitieron la detección de *H. pylori* cuando no era visible por tinción histológica, y no mostraron reacciones cruzadas con otros microorganismos, incluyendo los del género *Campylobacter sp.* Los inconvenientes son: la utilización de marcaje radiactivo, la necesidad de hasta 3 días para obtener resultados y la necesidad de, al menos,  $10^4$  células de *H. pylori* para detectarlos.

Estos primeros métodos de aplicación de la biología molecular al diagnóstico de

la infección por *H. pylori* se han mejorado con las técnicas de amplificación del ADN, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), capaces de detectar cantidades muy pequeñas del ADN específico. La molécula de ADN es muy estable químicamente y puede sobrevivir durante mucho tiempo, aunque el microorganismo no sea cultivable y no esté vivo (Dovan 1986). Tiene como desventaja la posibilidad de que las contaminaciones producidas durante la manipulación técnica de las muestras den resultados falsos positivos. Se ha descrito la presencia de ADN de *H. pylori* en endoscopios, por lo que es importante realizar la limpieza de la forma correcta (Roosendaal 1994). Sin embargo, desarrollando pautas estrictas de trabajo para el manejo de las muestras clínicas y de los productos de RCP, este problema puede solventarse (Wright 1990, Pershing 1991), y puede llegar a ser la técnica de diagnóstico más sensible y específica entre las estudiadas por algunos autores (Fabre 1994).

Se han diseñado diferentes iniciadores complementarios de secuencias de genes específicos de *H. pylori*.

Los primeros trabajos de RCP, para diagnóstico de la infección por *H. pylori*, se desarrollaron usando iniciadores que amplificaban secuencias altamente conservadas del gen 16S *ARNr* (Hoshima 1990, Ho 1991, Engstrand 1991, Mapstone 1991, Engstrand 1992). Tiene la ventaja de que estos genes han sido ampliamente estudiados en un gran número de microorganismos y por lo tanto, es fácil comparar las secuencias y evitar las que puedan dar lugar a reacciones cruzadas.

Otros autores han usado iniciadores basados en los genes que codifican la ureasa, con secuencias de nucleótidos del gen clonado de la ureasa (*ureA*) (Clayton 1992, Westblom 1991 b) o de las sub-unidades B, C y D (Gobert 1990, Valentine

1991). Los iniciadores diseñados para detectar los genes de la ureasa han sido elegidos para no mostrar homología con las regiones de otras bacterias que también presentan actividad ureásica (Jones 1989, Morsdorf 1990, Mulrooney 1990, Blanchard 1990).

Otras alternativas de elección de iniciadores han sido: fragmentos crípticos clonados del cromosoma de *H. pylori* (Valentine 1991), del gen de una proteína antigénica específica de *H. pylori* de 26 kDa sin ninguna función conocida (Hammar 1992), pero que parece ser específico de especie para evaluar las muestras de mucosa gástrica (O'Toole 1991), del gen de una proteína de 48 kDa, etc.

En muestras de biopsia conservadas en parafina se ha podido aplicar también la técnica de RCP (Weiss 1994), aunque en este caso los iniciadores se eligen de forma que los fragmentos a amplificar sean de menor tamaño, como 132 y 115 pb del gen *ureA* (Gobert 1990), probablemente porque el ADN es de peor calidad y existiría dificultad en amplificar los fragmentos grandes.

Se han realizado diferentes modificaciones sobre la metodología base de la RCP, como hacer una RCP anidada (Ho 1991), o RCP con transcriptasa inversa (RT-RCP) a partir de ARNr, que aumenta la sensibilidad de la técnica (Engstrand 1992, Peek 1995).

Estos métodos parecen ser 100% sensibles, aunque un estudio reciente encuentra que la RCP era tan sensible como el cultivo para confirmar erradicación y detectar fallo del tratamiento en 34 pacientes, a los que se les hizo seguimiento 3 meses después de finalizar un tratamiento triple (Van Zwet 1993).

Las técnicas moleculares se aplican, generalmente, en microorganismos difíciles de cultivar y de crecimiento lento, por lo que *H. pylori* es un buen candidato para la

utilización de este tipo de metodología. Tiene una serie de ventajas, como ser un método directo que detecta la presencia del genoma del microorganismo, ser un método rápido, siendo suficientes 24 a 48 h para obtener resultados, ser altamente sensible y específico y aplicable a diferentes tipos de muestras obtenidas por métodos invasivos o no invasivos. Algunos de los problemas que pueden existir con estas nuevas tecnologías son: la presencia de inhibidores de la Taq ADN polimerasa en la muestra, la excesiva sensibilidad (se pueden detectar formas no viables del microorganismo), la posibilidad de contaminación de las muestras negativas con ADN amplificado que puede producir falsos positivos, la elección empírica de los iniciadores y, sobre todo, la falta de estandarización en los métodos utilizados, que dificultan la comparación de los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigadores. Existen otros problemas que no están suficientemente estudiados, como son la gran diversidad genómica que presentan los aislamientos de *H. pylori* y que puede afectar a la eficacia de la amplificación, la presencia de mutaciones en la zona que se va a amplificar y que pudiera dar resultados negativos y la competición que se puede producir entre microorganismos que comparten características comunes. Existe un trabajo publicado en el que se detectaron pacientes sin evidencia histológica de infección y que, sin embargo, eran positivos por la técnica de RCP; además, los controles internos eran negativos. Los autores intentan explicar estos resultados positivos por la presencia de formas cocoides del microorganismo, la presencia de cepas no patógenas en estómagos normales o por la contaminación del endoscopio con ADN del microorganismo (Mapstone 1993 a).

## 1.6.2. MÉTODOS NO INVASIVOS

### 1.6.2.1 ESTUDIO SEROLÓGICO

La infección por *H. pylori* produce una respuesta inmune sistémica y local (Jones 1986, Rathbone 1986). Esto ha servido para desarrollar distintos ensayos diagnósticos, que van dirigidos a detectar los anticuerpos frente a *H. pylori*. A nivel de la mucosa se producen anticuerpos tipo IgA con mayor frecuencia, mientras que a nivel sistémico la respuesta inmune es esencialmente IgG (Rathbone 1986). Los anticuerpos IgM no parecen diferentes entre individuos *H. pylori* positivo y negativo (Jones 1986, Pérez-Pérez 1988). La detección de IgA a nivel sistémico no ha sido un hallazgo constante, por lo que los anticuerpos IgG son los que se buscan de manera prioritaria como respuesta a la infección por *H. pylori* (Rathbone 1986, Pérez-Pérez 1988).

Entre los métodos serológicos desarrollados se encuentran: aglutinación, fijación del complemento, inmunofluorescencia indirecta, "immunoblot", ELISA (Jones 1986, Von Wulffen 1986, Hirsch 1988 a, Newell 1989, Faulde 1991, López-Brea 1993 a). En general, los métodos de ELISA parecen ser más sensibles que la fijación del complemento (Jones 1986), y la sensibilidad aumenta si se estudia IgG e IgA (Rathbone 1986).

El aislamiento, identificación y purificación de antígenos específicos ha permitido desarrollar diferentes métodos de ELISAs, algunos preparados comercialmente (Evans 1989, Pérez-Pérez 1988, Newell 1988, Hirschl 1990, Talley 1991, Goossens 1992, Loffeld 1993). La sensibilidad y la especificidad de estos ensayos

está alrededor del 90%, comparándose siempre con el método de referencia; y pueden variar en los diferentes centros.

Otro criterio importante es establecer el punto de corte de positividad (cut off) de cada población antes de aplicar directamente las pruebas serológicas (Sanz 1993).

La mayor aplicación práctica de la serología ha sido en estudios epidemiológicos, permitiendo estudiar la tasa de prevalencia de *H. pylori* en varias poblaciones e investigar factores como origen geográfico, estado socio-económico, grupo étnico y edad (Dwyer 1988 a, Megraud 1989 a, Graham 1991). Se ha sugerido emplear técnicas serológicas, como procedimiento de "screening" previo a la endoscopia (Sobala 1991); sin embargo, esta medida se considera actualmente prematura y pueden no detectarse otras enfermedades digestivas.

Donde sí parecen estar indicadas las pruebas serológicas es en el seguimiento a largo plazo de pacientes tratados para erradicar *H. pylori*. Diversos estudios han mostrado el descenso del título de anticuerpos a los 6 meses de seguimiento, cuando ha habido erradicación del microorganismo (Veenendaal 1991, Kosunen 1992, Glupczynski 1992 a), mientras que un fallo en el tratamiento o una re-infección van acompañados normalmente de un aumento del título. Sin embargo, la cinética de disminución del título de anticuerpos no es la misma de unas personas a otras, sufriendo variaciones importantes, por lo que tampoco está claramente definido.

### 1.6.2.2 PRUEBA DEL ALIENTO

Esta técnica se basa en ingerir urea que contiene Carbono marcado. *H. pylori* presente en el estómago produce la hidrólisis de la urea y se libera el CO<sub>2</sub> marcado en el aliento, que puede ser cuantificado mediante un espectrofotómetro de masas. Se han encontrado mayores cantidades de CO<sub>2</sub> marcado, en el aliento de personas con *H. pylori* en la mucosa gástrica, que en las no colonizadas por esta bacteria (Rautelin 1991). Se han desarrollado dos tipos de pruebas que usan: urea-<sup>13</sup>C (Bell 1987) o urea-<sup>14</sup>C (Graham 1987). Son métodos fáciles de realizar, altamente sensibles y específicos para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* (Graham 1987, Mashall 1988 b, Rauws 1989, Debongnie 1991, Logan 1991 a).

**<sup>13</sup>C-UBT.** Es un isótopo natural, no radiactivo, que puede utilizarse sin riesgos. Se puede detectar la tasa de aclaramiento y la recurrencia después del tratamiento (Logan 1991 b), y puede usarse incluso 2 semanas después de terminarlo (Logan 1993).

**<sup>14</sup>C-UBT.** Aunque se utilizan dosis de radiactividad bajas, se limita su uso en cuanto al tipo de pacientes (no debe usarse en niños ni en mujeres embarazadas). Se ha recomendado esta prueba por ser más barata que la versión <sup>13</sup>C-UBT.

Los dos métodos tienen buena sensibilidad y especificidad, comparando con histología y cultivo (Graham 1987, Marshall 1988 b, Rauws 1989, Debongnie 1991, Logan 1991 a). Son métodos no invasivos aceptables para conocer la infección por *H. pylori* antes del tratamiento y para monitorizar la respuesta al tratamiento, pero no hay estandarización en los protocolos y puede usarse diferente metodología y valores de "cut off", por lo que es necesario realizar estudios locales de validación.

### 1.6.2.3 TÉCNICAS MOLECULARES

Se han realizado estudios sobre la detección de *H. pylori* en diferentes muestras, que se pueden obtener por métodos menos agresivos, como jugo gástrico obtenido con sonda nasogástrica, o muestras nada agresivas como saliva, placa dental o heces. Los cultivos de este tipo de muestras han sido informados de manera esporádica por la dificultad que supone (Shames 1989, Krajden 1989, Majmudar 1990, Thomas 1992). El uso de técnicas moleculares de amplificación parecen abrir un posible camino al diagnóstico de la infección por *H. pylori* por métodos directos y no invasivos, aunque se encuentran todavía en investigación (Alarcón 1994).

El estudio de jugo gástrico obtenido mediante sonda nasogástrica, y aplicando técnicas moleculares de diagnóstico como RCP, ha sido utilizado por algunos autores y han conseguido buenos resultados: un 96% de sensibilidad y un 100% de especificidad (Westblom 1991 c, Westblom 1993 b).

La presencia de *H. pylori* en la cavidad oral puede estar producida por dos motivos: que la cavidad oral sea un reservorio donde se encuentra *H. pylori* y a partir de ella se coloniza el estómago no dañado, o que *H. pylori* sea flora transitoria que llega a la cavidad oral a partir de reflujo gástrico. En cualquier caso, supone una posibilidad de diagnóstico potencial. La detección por medio del cultivo es difícil de realizar y las técnicas moleculares pueden ser útiles.

La utilización de muestras fecales, como diagnóstico de la infección, también está en estudio, habiéndose conseguido el cultivo a partir de heces (Thomas 1992, Kelly



1994), aunque es difícil de realizar porque *H. pylori* se encuentra como formas cocoides. Esto no es problema para la RCP, que es capaz de detectar a organismos no viables. Mapstone y col. detectaron *H. pylori* mediante RCP (Mapstone 1993 b), pero Van Zwet y col. trataron de repetir la técnica eliminando los inhibidores de la reacción de la RCP, sin obtener resultados positivos (Van Zwet 1994).

Los resultados existentes con aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa a muestras de saliva y heces son todavía preliminares. Parece que la presencia de *H. pylori* en heces y/o muestras de la cavidad oral se relaciona con pacientes con gastritis, pero no con pacientes con mucosa normal (Hammar 1992, Mapstone 1993 a, Mapstone 1993 b, Nguyen 1993). Estos estudios apoyan la idea de la transmisión persona-persona (oral-oral o fecal-oral) como principales rutas de transmisión.

## 1.7 CARACTERÍSTICAS DE *H. pylori*

*Helicobacter pylori* es sumamente diverso en cuanto a la organización físico-química del cromosoma. El tamaño del genoma es pequeño, aunque varía de unas cepas a otras (oscila entre 1,6 a 1,73 megabases) (Taylor 1992 a, Taylor 1992 b). Presenta un alto grado de variación genómica, que puede ser explicado por la competencia natural a la transformación genética (Nedenskov-Norensen 1990) y la alta tasa de recombinación que ocurre en este microorganismo. La transformación genética y la alta recombinación pueden ser un mecanismo natural "in vivo" para diseminar genes de patogenicidad y resistencia a agentes antimicrobianos, teniendo implicaciones importantes en el tratamiento de la gastritis asociada a *H. pylori*.

*Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa, de forma bacilar, con extremos redondeados, que mide de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho y 2.5 a 4.0  $\mu\text{m}$  de longitud (Goodwin 1985 b, Jones 1985). Cuando se observa la bacteria en la mucosa gástrica es generalmente curvada, sinuosa o espirilar (Fig 1). Posee flagelos múltiples, en número de 4 a 6, que están unidos en un polo y tienen 2.5  $\mu\text{m}$  de largo y 30 nm de grueso (Fig 2). En el cultivo en medio sólido pueden ser deficientes en flagelos (Goodwin 1990) y las formas espirales pueden ser escasas o estar ausentes y generalmente no se observan tan curvados (Armstrong 1987, Megraud 1988) (Fig. 3). Pueden aparecer formas cocoides, después de múltiples pases en el laboratorio, posiblemente como respuesta a condiciones nutricionales desfavorables; estas formas también se han observado en heces (Mai 1989) (Fig. 4).



Fig 1. Imagen de bacilos Gram negativos curvados en una muestra de mucosa gástrica, teñida mediante tinción de Gram.

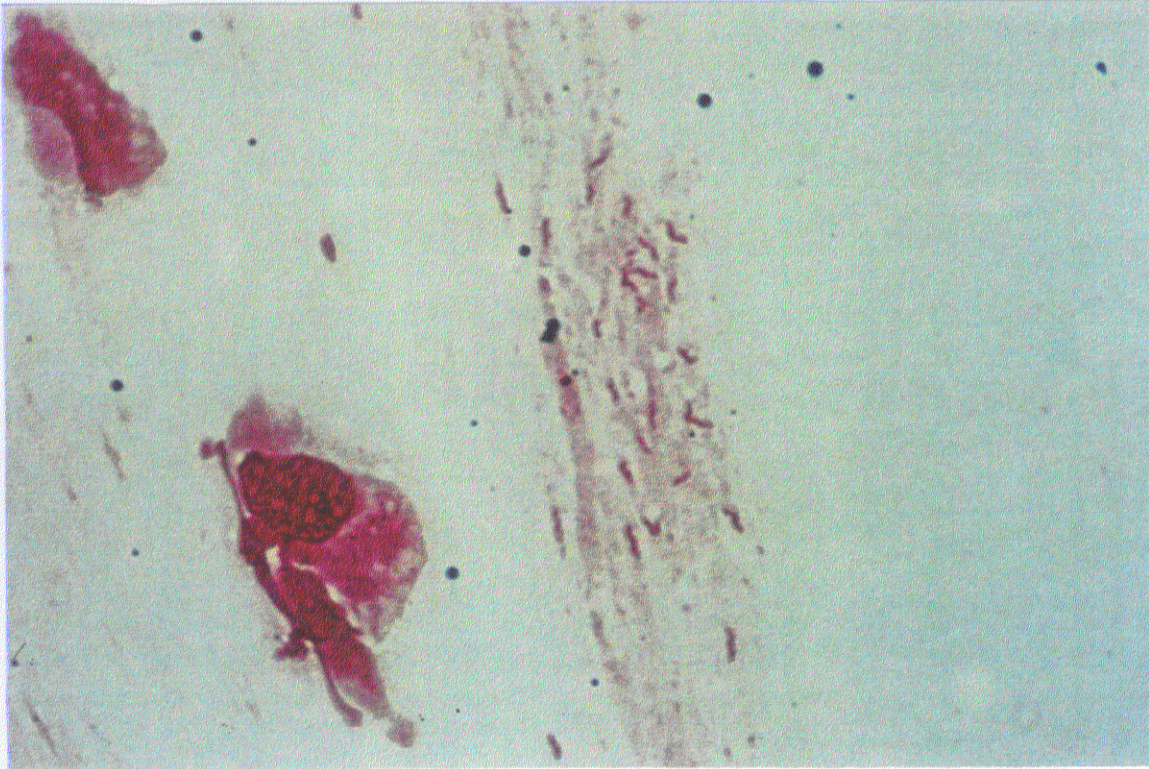


Fig 2. Imagen de bacilos curvados en los que se observan los flagelos múltiples polares.





Fig 3. Tinción de Gram de colonias de *H. pylori* cultivadas en medio de agar sangre.

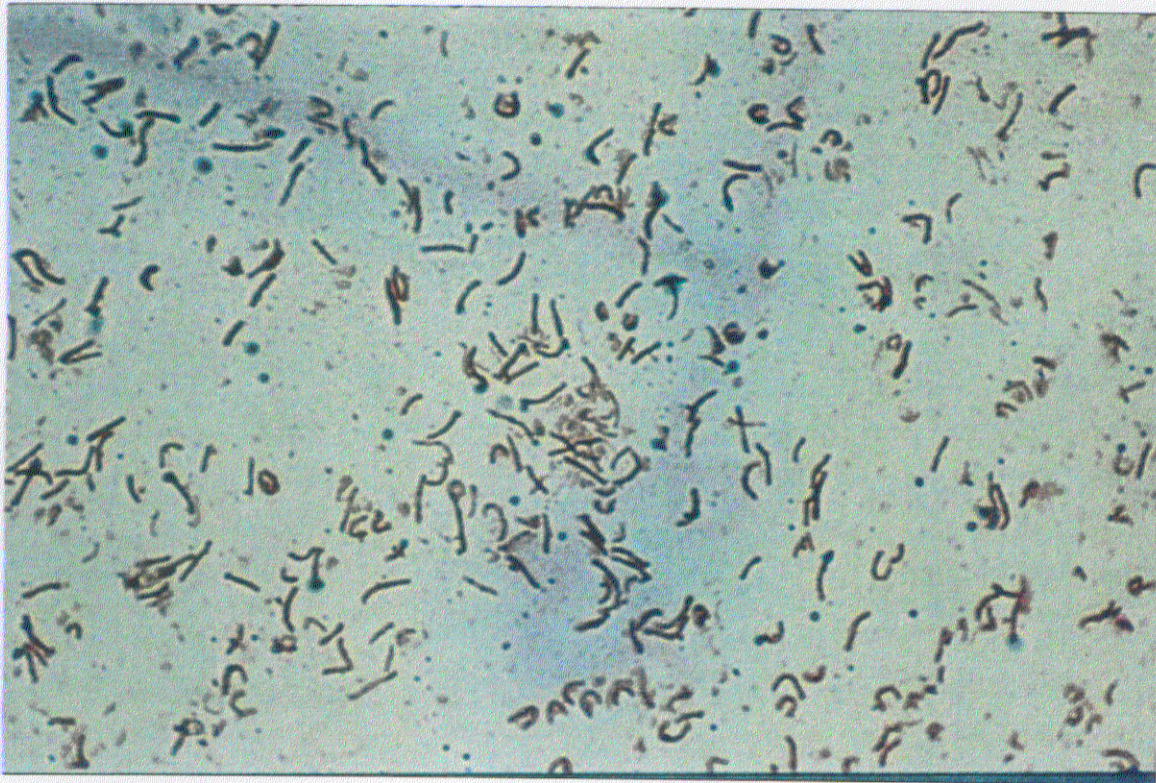
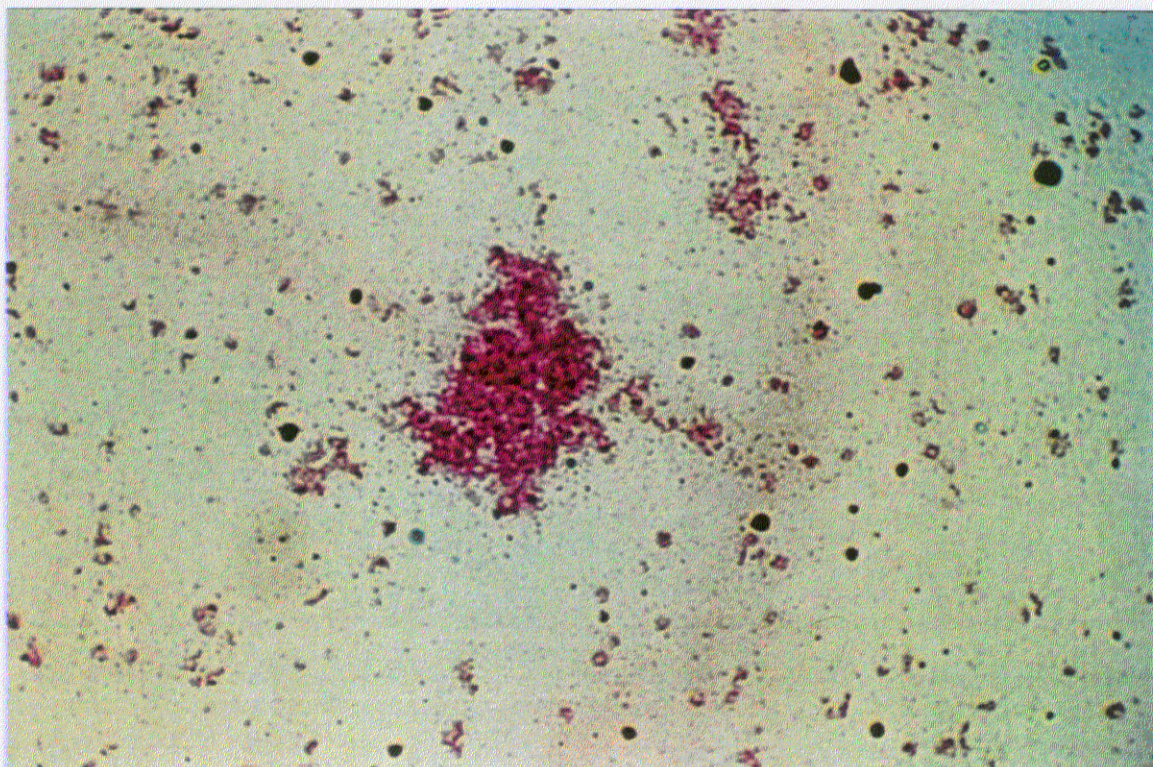


Fig 4. Imágenes de formas cocoides de *H. pylori*, obtenidas a partir de un cultivo viejo en medio de agar sangre.





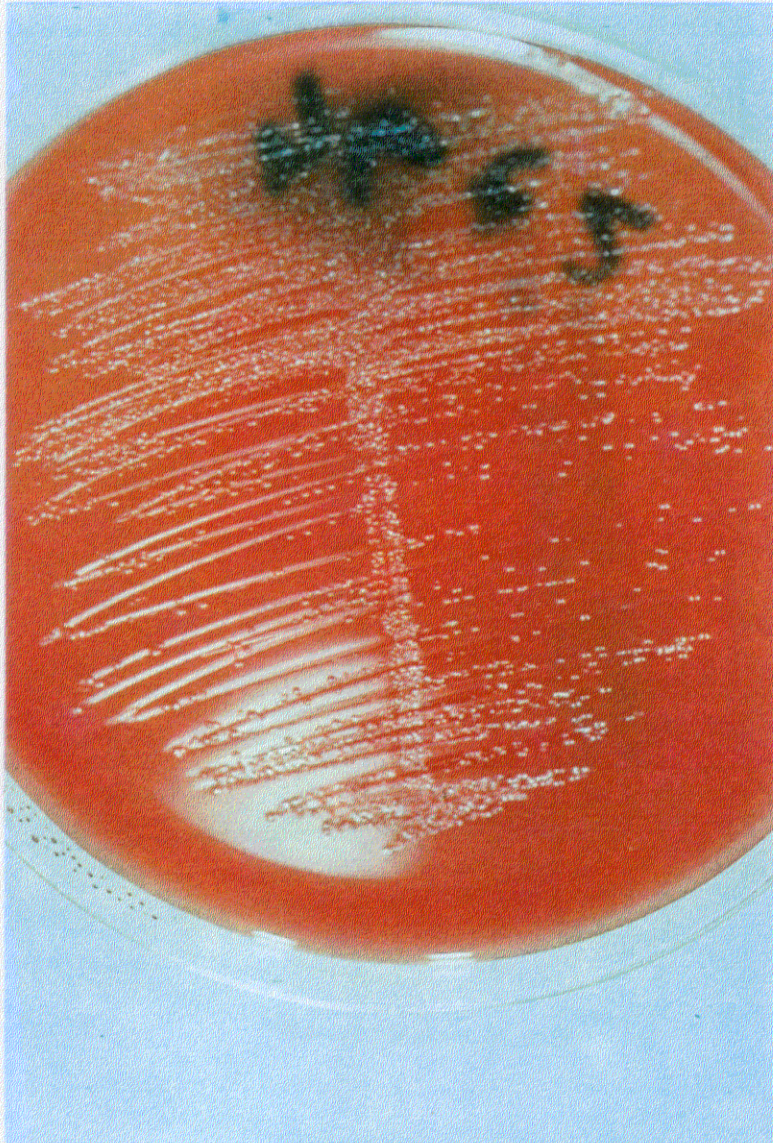
### 1.7.1 IDENTIFICACIÓN

El aislamiento de *H. pylori* puede obtenerse después de 5 a 7 días de incubación a 37°C, en atmósfera microaerofílica a partir del aislamiento primario, o de 48 h en subcultivo. Las colonias tienen una morfología característica: brillantes, grisáceas, pequeñas, de aproximadamente 1mm de diámetro (Fig 5). La tinción de Gram de las colonias puede mostrar bacterias curvadas típicas de *H. pylori*. Las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y ureasa positivas identifican el aislamiento como *H. pylori* (Langenberg 1984, Kasper 1984). Otras pruebas bioquímicas que se pueden realizar son la hidrólisis del hipurato y la reducción de los nitratos (que son negativas). Produce gammaglutamil transpeptidasa, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida (Goodwin 1990). No fermentan glucosa ni otros carbohidratos (Megraud 1985).

Recientemente se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal, dirigido frente a la proteína de membrana externa de 30 kDa de *H. pylori*, que puede usarse para identificar *H. pylori* y no muestra reacción cruzada con *H. felis* y *Campylobacter jejuni* (Bölin 1995).



Fig 5. Cultivo de *H. pylori* en medio de agar Columbia con 5% de sangre de carnero, después de 48 h de incubación en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, donde se observa la morfología de la colonia.





### 1.7.2 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Para su cultivo en el laboratorio, necesita sangre o suero de carnero o caballo, aunque también se ha obtenido el cultivo con otros suplementos (Buck 1987, Goodwin 1990). Si se cultiva en medio líquido se necesitan 3 días para obtener un crecimiento adecuado, pero si se mantiene en agitación, es suficiente con 24 h (Goodwin 1985 a, Morgan 1987 a).

Es capaz de crecer en un amplio margen de pHs, desde pH 2.9 a 9.2 en un medio de Brucella con agar, pero no crece a pH 2.6 ni a 9.4 (Goldie 1988). Cuando el medio utilizado es BHI con 10% de suero de caballo y 0.25% de extracto de levadura, *H. pylori* crece bien entre pH 6.6 y 8.4 y a unas temperaturas de 33 a 40.5°C, pero no a 25 ni a 42°C (Goodwin 1985 b, Goodwin 1986 a), aunque algunos autores indican que pueden crecer a 42 °C (Buck 1986), probablemente dependiendo del medio de cultivo utilizado. Se ha visto que *H. pylori* puede permanecer vivo a pH 1.9 a 2 en presencia de urea 5 mM (Tomkins 1987, Marshall 1988 c). No crece en agar sangre en presencia de 5% de bilis; crece poco en 0.5 a 1 %, pero sí que crece bien en 0.1 % de bilis (Tomkins 1987). La ureasa tiene actividad entre pH 3.1 a 7.1.

### 1.7.3 FACTORES DE PATOGENICIDAD

Actualmente se considera que *Helicobacter pylori* desempeña un papel patogénico fundamental. Entre otros estudios, se ha demostrado que después de la ingestión de estos microorganismos se produce un proceso inflamatorio en la mucosa gástrica normal (Marshall 1985 a, Morris 1987).

Se han descrito en *H. pylori* varios factores de virulencia y diversos mecanismos de adaptación que, en las circunstancias apropiadas y en el huésped susceptible, conducen a la patogénesis y al desarrollo de la enfermedad.

Los factores de virulencia estudiados se pueden clasificar en factores invasivos, que le permiten atravesar el epitelio cutáneo mucoso (morfología espiral, movilidad, enzimas que facilitan la invasión: ureasa, proteasas, lipasas, catalasa), y factores tóxicos que dañan la mucosa gástrica (citotoxina).

La morfología espiral o helicoidal y su movilidad le facilitan el paso a través de ambientes como el "mucus", de manera más eficaz que otros microorganismos curvados (Goodwin 1990, Lee 1991). La movilidad parece ser un factor de virulencia y de colonización importante (Eaton 1992). El filamento flagelar de *H. pylori* se ha analizado detalladamente a nivel bioquímico y genético (Leying 1992, Suerbaum 1993, O'Toole 1994, Hurtado 1994 a). Variantes no móviles de *H. pylori* no colonizan la superficie gástrica en modelos animales, sugiriendo que las cepas móviles son más patógenas que las no móviles (Eaton 1989).

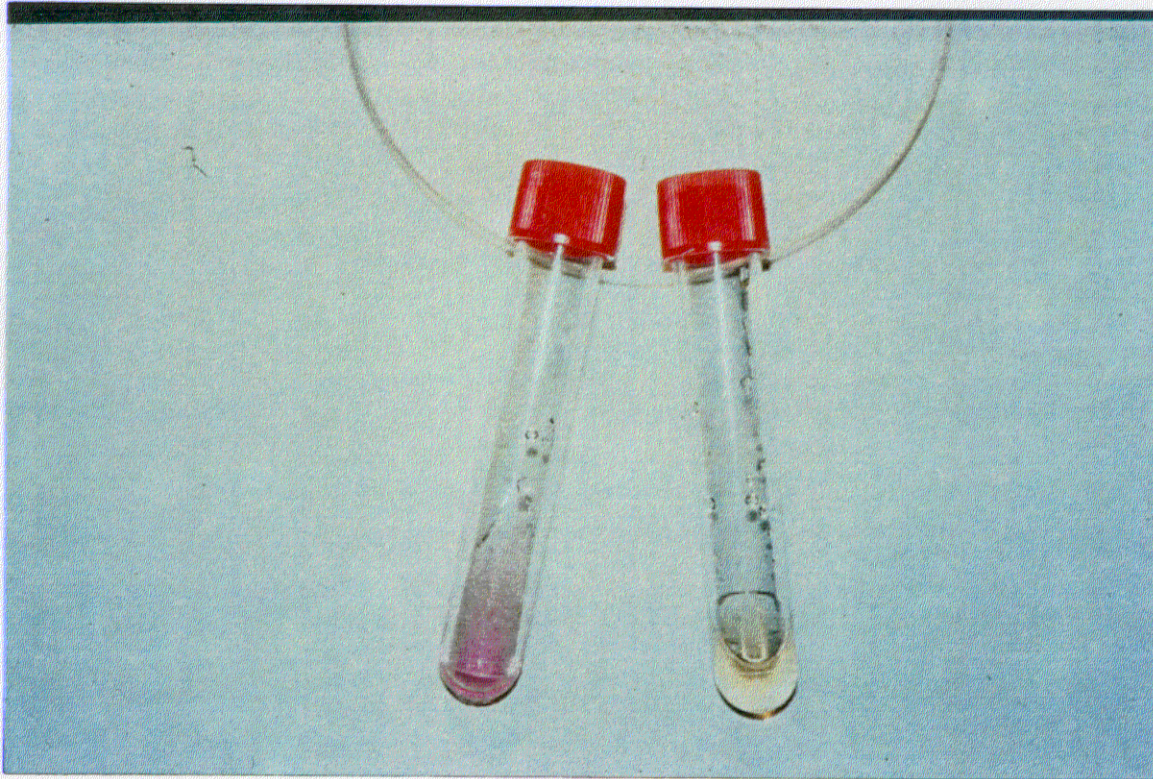


La ureasa de *H. pylori* se encuentra localizada en la membrana externa y en el espacio periplásmico (Bode 1989) y se ha propuesto como un factor de virulencia importante (Hobley 1991). La ureasa bacteriana desdobla la urea presente en el medio liberando amonio que eleva el pH. Esta reacción puede ser medida en el laboratorio añadiendo un indicador de pH (Fig 6). Entre las posibles funciones que desarrolla la ureasa, cabe citar la protección de la bacteria frente al ácido de la mucosa gástrica (El Nujumi 1991) y la provisión de nitrógeno nutricional para el microorganismo en forma de amonio (Ferrero 1988). El amonio generado por este enzima se acumula en la capa de mucina gástrica, causando una pérdida del equilibrio iónico (Thomson 1989) y originando un daño en las células epiteliales gástricas, (Megraud 1992, Taujii 1992) que parece contribuir a la patogénesis de la úlcera gástrica. Se han podido obtener en el laboratorio mutantes ureasa negativos que no son capaces de colonizar los cerditos gnotobióticos, independientemente de que muestren actividad ácida del estómago normal o que se hayan vuelto aclorhídricos (Eaton 1994). Por lo tanto, este estudio confirma que la ureasa es indispensable para la colonización, pero, además, la protección ácida del estómago no es la única función de la ureasa (Suerbaum 1995).

*H. pylori* afecta también a la integridad de la mucosa gástrica, mediante la elaboración de proteasas y lipasas, que degradan las proteínas y los lípidos, componentes importantes del "mucus" (Slomiany 1987, Slomiany 1992 a, Slomiany 1992 b) y, junto con la proliferación bacteriana, ocasiona un desequilibrio en la mucosa (Sarosiek 1988, Slomiany 1991).



Fig 6. Prueba positiva de la ureasa en un aislamiento clínico de *H. pylori*, comparada con un control negativo.





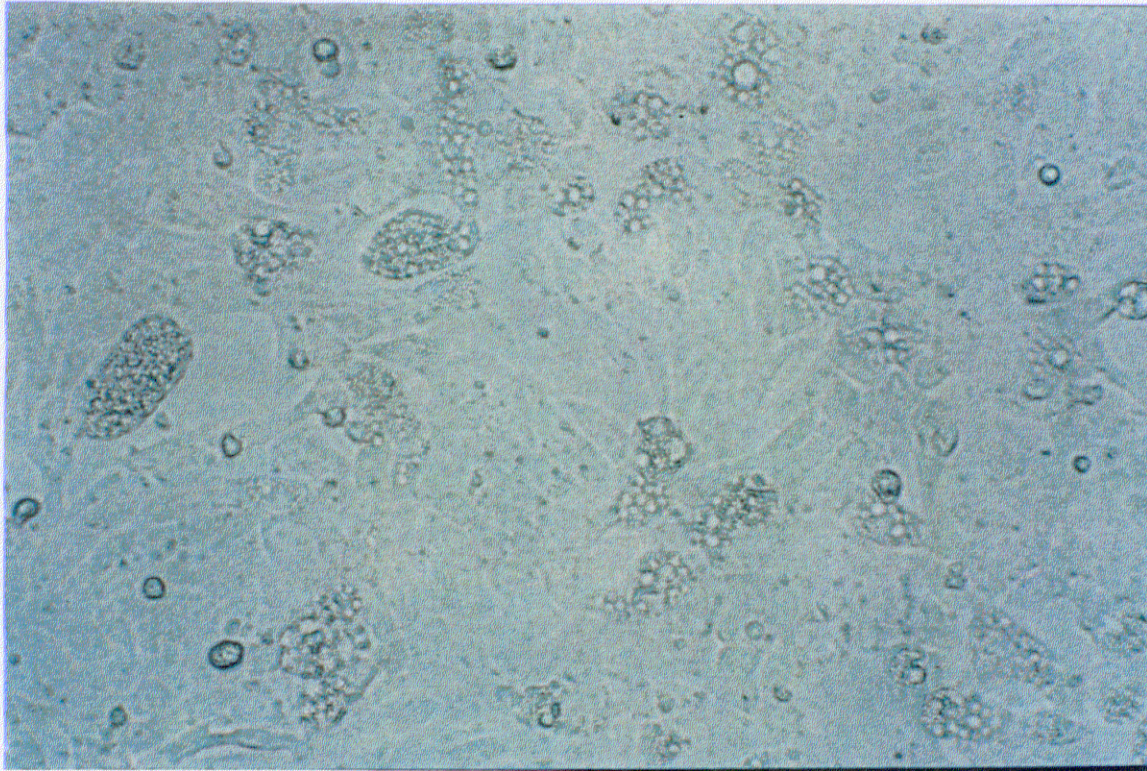
La catalasa de *H. pylori* es muy potente, comparada con otros microorganismos; protege a la bacteria de los efectos letales de los metabolitos del Oxígeno, pero no es imprescindible para romper el  $H_2O_2$  generado por su metabolismo endógeno, porque cepas catalasa negativa son capaces de sobrevivir en el laboratorio (Mai 1989, Hazell 1991, López-Brea 1993 b). La catalasa puede ayudar a que la bacteria sobreviva en la mucosa gástrica inflamada, destruyendo el peróxido de hidrógeno generado por las células inflamatorias (Hazell 1991).

La presencia de adhesinas en *H. pylori* no se ha probado como un factor de colonización, pero parece aceptado que se une al epitelio gástrico por medio de estas adhesinas específicas (Noach 1994, Suerbaum 1995). *H. pylori* se une a las diferentes líneas celulares (Nilius 1994, Armstrong 1991) y ésta unión puede ser inhibida por subcitrato de bismuto, mientras que omeprazol o cimetidina no tienen ningún efecto (Wagner 1994). Los genes que codifican para estas adhesinas han podido ser clonados y estudiados a nivel molecular (Lingwood 1993, Evans 1993).

Se ha purificado y caracterizado una toxina vacuolizante (Cover 1992), que produce efecto citopático no letal y vacuolización en una variedad de líneas celulares de mamíferos (Fig 7) (Leunk 1988, Hupertz 1988). Este fenómeno se ha descrito en aproximadamente la mitad de los aislamientos clínicos en diferentes regiones geográficas (Leunk 1988), observándose diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de pacientes con úlcera péptica y las de pacientes con gastritis crónica (Figura 1989, Cover 1990).



Fig 7. Efecto vacuolizante producido por un cultivo de *H. pylori* en células Vero (foto superior), comparado con el cultivo celular intacto (foto inferior).





Recientemente se han realizado avances significativos en la comprensión de la biología de la citotoxina vacuolizante y su papel en el proceso patogénico. Cuatro grupos de investigadores han clonado de manera simultánea el gen *vacA* (vacuolizante), de 3.9 kb de tamaño, que codifica la proteína responsable de la vacuolización (Telford 1994 a, Cover 1994, Phadnis 1994, Schmitt 1994). El gen *vacA* codifica una proteína de 139 kDa que contiene 3 partes: una secuencia líder de 33 aminoácidos, la citotoxina propiamente dicha (83 a 94 kDa) y un fragmento C-terminal de 50 kDa, que podría ser necesario para la secreción de la citotoxina y el paso a través de la membrana externa. Se han obtenido mutantes isogénicos de este gen (Cover 1994, Phadnis 1994, Schmitt 1994) que no expresan la citotoxina, perdiendo su actividad vacuolizante. La toxina de *H. pylori* no muestra homología con las de otros microorganismos, por lo que resulta más difícil estudiar su mecanismo de acción (Papini 1994). Esencialmente todas las cepas de *H. pylori* poseen un gen homólogo del *vacA*, lo que no se sabe es porqué unas cepas lo expresan y otras no. El análisis de la secuencia parcial del gen *vacA* de una cepa no citotóxica, ha revelado diferencias importantes en cuanto a la funcionalidad, y parece probable que las cepas no citotóxicas produzcan genes no funcionales (Cover 1994). La toxina purificada y administrada oralmente a ratones produce lesiones en la mucosa gástrica, lo que apoya el papel de la proteína VacA en la patogénesis (Telford 1994 b).

Se detectó una proteína de 120-130 kDa, codificada por el gen *cagA* (cytotoxin associated gen), cuya expresión parecía estar relacionada con la producción de la toxina y se encontraba con mayor frecuencia en los aislamientos de pacientes con sintomatología más grave, como úlcera duodenal o tumores gástricos (Covacci 1993,

Crabtree 1993). Sin embargo, la mutación en el gen *cagA* no afecta a la expresión de la citotoxina (Schmitt 1994, Tummur 1994), por lo que no parece ser la proteína responsable. La relación de la proteína CagA con la citotoxina no está clarificada aunque se están realizando estudios con gran número de cepas que permitan conocer esta relación (Labigne 1994, Xiang 1995). Parece que la mayoría de las cepas citotoxina positiva también producen el antígeno CagA, y que la mayoría de las cepas aisladas de muestras de pacientes con úlcera duodenal producen las proteínas CagA y VacA. Pero queda todavía mucho trabajo por realizar para clarificar el papel de estas proteínas y su implicación clínica (Suerbaum 1995).

No se ha encontrado función biológica clara para CagA, pero se le ha dedicado mucha atención porque presenta anticuerpos circulantes que se correlacionan con la úlcera duodenal y los tumores gástricos (Covacci 1993, Crabtree 1993). La mayoría de cepas de *H. pylori* que no tienen el gen *cagA* tampoco tienen un gran fragmento del cromosoma (Covacci 1993, Xiang 1995). La expresión del *cagA* parece estar asociada con la capacidad de las cepas para inducir la síntesis de la interleuquina 8 "in vitro" (Crabtree 1994, Crabtree 1995). Sin embargo, la falta de funcionalidad del gen *cagA* no afecta a esta propiedad (Sharma 1994), por lo que deben existir otros genes, asociados con el fenotipo CagA positivo, que sean los responsables de la inducción de la síntesis de interleuquina 8.

Los aislamientos clínicos de *H. pylori* pueden clasificarse en dos tipos principales: tipo I y II (Telford 1994 a, Xiang 1995). El tipo I constituye aproximadamente el 65% de los aislamientos y produce VacA y CagA. El tipo II supone el 19% de los aislamientos clínicos y no produce VacA ni CagA. el resto de

aislamientos (16%) presenta un fenotipo relacionado con el tipo I pero que expresan el CagA o el VacA pero no las dos (Xiang 1995). Casi todos los pacientes con patología gastroduodenal graves están infectados con el tipo I (Covacci 1993), es decir, CagA + VacA+ (Crabtree 1993).

Los últimos trabajos presentados sobre este tema en el VIII International Workshop on Gastroduodenal Pathology and *Helicobacter pylori*, Edimburgo Julio 1995, clasifican los microorganismos de acuerdo con el patrón de genotipo *vacA*, que parece relacionarse mejor con la gravedad de la patología presentada por el paciente. Detectan 3 genotipos basados en la región de la señal de la secuencia del gen *vacA* (s1a, s1b y s2) y dos genotipos basados en la región media del gen (m1 y m2). Los autores concluyen que el genotipo de la región media no está asociado con el estatus de la úlcera, la inflamación o la densidad de la colonización, y que, sin embargo, el genotipo de la señal de la secuencia sí que lo está. Es más frecuente la presencia de ulceración, mayor densidad de neutrófilos y linfocitos y mayor colonización entre los pacientes que mostraban cepas de genotipo s1a que entre los que mostraban s1b (con valores intermedios) y que los que mostraban s2 (Atherton 1995).

Además, en este último congreso se han presentado los trabajos que han detectado nuevos genes, como el *cagH* (Akopyants 1995 a) o el *cagB* y *cagC* (Karita 1995). Se ha propuesto un cambio de nomenclatura: los genes *cagB* o *cagH* se denominarían *picA* (permits induction citokines) y el *cagC*, *picB*, debido a que su papel fundamental parece ser que permite la inducción de citoquinas y tendría como misión la regulación de los diferentes genes de patogenicidad (Blaser 1995).

En estudios recientes se ha observado que las diferentes cepas de *H. pylori* se

pueden agrupar por homología de ADN-ADN en cuanto a la patología que producen, siendo más similares entre sí las cepas que producen úlcera gástrica, las que producen úlcera duodenal y las que no producen síntomas (Yoshimura 1993).

Es posible que en el futuro los métodos de diagnóstico deban ir dirigidos a detectar la presencia de las cepas patógenas, con métodos como el de RCP, a partir de muestras invasivas o no invasivas (Censini 1993).

Se ha detectado que *H. pylori* produce un factor que inhibe la secreción del ácido en las células parietales de conejo (Cave 1989) y de humanos (Jablonowski 1994). Se ha observado una inhibición similar con extractos del microorganismo que contienen 2 ácidos grasos que son parte de los lipopolisacáridos y fosfolípidos de *H. pylori* (Piotrowski 1992, Beil 1994). La importancia de estos hechos "in vivo" todavía no se ha establecido.

Se ha sugerido que la expresión de proteínas de choque térmico juega un papel en la patogénesis de *H. pylori* porque induce una respuesta autoinmune. El gen *hspB* se ha clonado y secuenciado (Macchia 1993) y se ha visto que forma parte de un operón bicistrónico (*hspA-hspB*). La expresión de las proteínas de choque térmico HspA y HspB, junto con la ureasa de *H. pylori*, aumenta la actividad de la ureasa (Suerbaum 1994, Kansau 1994), quizá porque integran el níquel que la ureasa necesita para ser funcional.

Se están estudiando otras proteínas con un posible papel en la patogénesis: las ATPasas, que parecen ser el blanco de acción de los inhibidores de la bomba de protones (Iwahi 1991, Suerbaum 1991). Se ha clonado y secuenciado la ATPasa tipo P, probablemente implicada en el transporte de cobre (Ge 1995).



La fumarato reductasa también puede jugar un papel importante en la patogénesis (Birkholz 1994), así como la alcohol dehidrogenasa (Kaihovaara 1994), una lipoproteína de 20 kDa (Kostrzynska 1994) o la superóxido dismutasa (Spiegelhalder 1993). Se ha descrito la presencia de un gen con 100% de identidad con el de las mucinasas de *Vibrio cholerae* (Smith 1994), aunque parece que este gen varía de forma importante entre diferentes cepas de *H. pylori* (Hurtado 1994 b) y necesita ser estudiado más profundamente.

En el estudio de los factores de patogenicidad de *H. pylori*, quedan todavía muchas cuestiones por estudiar y resolver. Se necesita un modelo animal más barato y disponible que el del cerdito gnotobiótico para poderlo utilizar en este tipo de estudios (Tsuda 1994). Los estudios de biología molecular también son de gran ayuda para conocer la ecología, diversidad genética y la estabilidad del genoma de *H. pylori* "in vivo" (Akopyantz 1995 b). Es importante detectar los factores implicados en la inducción de linfomas y en la carcinogénesis, que sin duda será un objetivo importante en la investigación en un futuro próximo. También es de gran interés conocer el papel de las formas cocoides de *H. pylori* (Chan 1994), si son viables o no y qué importancia tienen en la epidemiología.

## 1.8 MÉTODOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS PARA DIFERENCIAR CEPAS

Se han usado diferentes métodos fenotípicos y genotípicos para intentar diferenciar entre re-infecciones y recaídas, así como para intentar el agrupamiento de las cepas aisladas de miembros de la misma familia (Clayton 1991 a).

### 1.8.1 Antibiotipado.

El patrón de resistencia a antibióticos ha sido utilizado para diferenciar cepas en otras especies bacterianas; sin embargo, en el caso de *H. pylori* no es aplicable este método, puesto que la mayoría muestran patrones muy similares (Morgan 1987 b). Además, la resistencia puede aparecer durante el tratamiento con antibióticos como metronidazol o claritromicina y no tendría suficiente poder discriminatorio.

### 1.8.2 Biotipado.

*H. pylori* parece ser muy homogéneo en cuanto a la actividad bioquímica que se puede detectar mediante el perfil de actividad de las enzimas preformadas. Las enzimas preformadas pueden ser detectadas "in vitro" por el sistema API ZYM (BioMerieux) y pueden servir en algunas ocasiones para diferenciación de cepas (Megraud 1985, McNulty 1987, Megraud 1989 b, Owen 1990 a).

Kung y col. detectan 3 biotipos entre 50 aislamientos estudiados (Kung 1989), mientras que Owen y col. detectan 4 biotipos entre los 40 aislamientos estudiados

(Owen 1990 a). También se pueden agrupar los aislamientos según la movilidad y la citotoxicidad que presenten (Owen 1991 a), según los patrones de hemaglutinación, usando eritrocitos de 11 especies animales (Wadstrom 1990) o los patrones de coaglutinación con antisueros preparados frente a aislamientos individuales de *H. pylori* (Danielsson 1988).

En general, los esquemas de biotipado, basados en la detección de enzimas preformadas o en la detección de características fenotípicas, no producen discriminación significativa entre los aislamientos de *H. pylori* y, por lo tanto, se les ha aplicado de manera muy limitada.

### 1.8.3 Serotipado

Lior ha desarrollado un sistema de serotipado para *H. pylori* que podría ser prometedor para estudios epidemiológicos, porque identifica relativamente pocos grupos (Lior 1991), aunque, precisamente por esto, puede que no tenga la suficiente resolución para determinar si los aislamientos derivan del mismo, o si los miembros de la misma familia son iguales o no.

### 1.8.4 Estudio de proteínas

El estudio de las proteínas totales, analizadas en geles de SDS-PAGE, es un método útil para identificación de especie pero no como método de tipado, pues los patrones que se obtienen entre los diferentes aislamientos de *H. pylori* son muy uniformes (Megraud 1985, Owen 1989 a). Los primeros estudios describen la presencia de siete bandas principales de proteínas comunes a todas las cepas y no existe variación

entre bandas de menor importancia (Pearson 1984, Megraud 1985).

El estudio de proteínas de membrana externa puede mostrar ciertas variaciones entre diferentes cepas, pudiendo servir como método de tipado. Goodwin y col. han desarrollado un sistema de tipado basado en 4 proteínas de membrana externa principales (Goodwin 1990).

Más recientemente, se han realizado intentos de analizar objetivamente los patrones de proteínas, utilizando geles de SDS-PAGE de alta resolución (Owen 1991 a, Costas 1991) e incorporando un densitómetro para el registro exacto de datos, y han demostrado la capacidad de diferenciar aislamientos de *H. pylori* (Owen 1989 a, Owen 1989 b, Trinel 1989, Costas 1992).

También se ha estudiado la caracterización de las proteínas de este microorganismo, mediante la aplicación del SDS-PAGE en dos dimensiones (2D-SDS-PAGE ó 2DGE), que consiste en un isoelectroenfoque en la primera dimensión y un SDS-PAGE en la segunda. Este método facilita la identificación de proteínas múltiples, que son difíciles de distinguir mediante SDS-PAGE. Las cepas de *H. pylori* muestran una extraordinaria similitud entre ellas, ya sean de distinto origen geográfico, o de distinto origen clínico (Dunn 1987, Dunn 1989).

Por otra parte, estudios más recientes informan que, el análisis de diferentes aislamientos de *H. pylori*, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-metionina marcada con el radioisótopo  $^{35}\text{S}$  (RADIO-PAGE), es un método más sensible en la discriminación epidemiológica de cepas de este microorganismo (Clayton 1991 a). Este método mostró más sensibilidad que los geles de SDS-PAGE estándar; la mayor variación se encontraba entre los polipéptidos de alto peso molecular entre 69 y 200

kDa (Clayton 1993). La reproducibilidad y el alto nivel de resolución obtenido con RADIO-PAGE indican que puede ser utilizado como método de tipado para *H. pylori* y puede aplicarse a cepas aisladas de pacientes, con sintomatología o sin ella, para tratar de determinar si existen cepas más virulentas de *H. pylori*.

Se ha desarrollado también un sistema de tipado basado en los patrones de bandas detectados por "inmunoblot", usando suero de conejo hiperinmune (Burnie 1988), que demostró que la región entre 29 y 44 kDa daba lugar a la mejor discriminación entre los aislamientos, siendo útiles para diferenciar entre re-infecciones y recaídas (Morgan 1991, Clayton 1993).

#### 1.8.5 Estudio de ADN plasmídico

Los factores de virulencia codificados por plásmidos han jugado un papel importante en la interacción huésped-bacteria y en la patogénesis de las enfermedades producidas por determinadas bacterias. Se han llevado a cabo estudios de análisis del ADN plasmídico de *H. pylori* para intentar conocer su posible implicación en la patogenia (Tjia 1987, Penfold 1988).

Las principales técnicas de aislamiento y caracterización de plásmidos están basadas en una lisis alcalina y en la posterior visualización por electroforesis en gel de agarosa (Birmboim 1979, Kado 1981), o simplemente en una electroforesis del ADN cromosómico bacteriano sin digerir, extraído por los métodos habituales.

Cuando se publicaron los primeros trabajos que detectaban la presencia de plásmidos en *H. pylori* (Tjia 1987, Penfold 1988), se pensó que éstos podrían ser

utilizados para diferenciar aislamientos, como en otras especies bacterianas, pero posteriormente se observó que sólo un 35 al 50% de los aislamientos presentan plásmidos, lo que dificulta su utilización en estudios epidemiológicos (Tjia 1987, Penfold 1988, Majewski 1988, Simor 1990 b, Kleanthous 1991, Dworkin 1991, Stanley 1992).

En general, llevan un único plásmido (Penfold 1988), con tamaños que oscilan entre 1.8 a 63 kpb, aunque la mayoría son de 1.8 a 22 kpb (Simor 1990 b, Dworkin 1991, Stanley 1992), y los patrones que se observan en los aislamientos que llevan plásmidos son muy diversos. Los plásmidos parecen ser estables en el laboratorio en pases sucesivos, aunque no se sabe si los aislamientos recientes contienen plásmidos que se pierden rápidamente después de subcultivar el microorganismo. Las cepas de *H. pylori* que han sido estudiadas en sus aspectos patogénicos más importantes, como resistencia a antibióticos, producción de ureasa, citotoxicidad o movilidad, no mostraron diferencias en el contenido de plásmidos y no es posible adjudicar un fenotipo concreto a un plásmido en particular (Tjia 1987).

En un estudio, los aislamientos obtenidos a partir de muestras de biopsias de cuerpo y de antro del mismo paciente, mostraron diferentes perfiles plasmídicos, sugiriendo la presencia de dos subtipos de *H. pylori* (Penfold 1988).

La utilización de perfiles plasmídicos, como posible esquema de tipado epidemiológico molecular para *H. pylori*, queda limitado por el bajo porcentaje de cepas que presentan estos elementos genéticos.

### 1.8.6 Estudio de ADN cromosómico

El estudio del ADN cromosómico de *H. pylori* proporciona un análisis genético más estable que los realizados con las técnicas anteriores. En general, todos los métodos que estudian el ADN genómico indican la gran heterogeneidad que existe entre los aislamientos de *H. pylori* (Megraud 1994).

Aunque existen ciertas diferencias en los distintos procedimientos de extracción de ADN, los métodos actuales son, por lo general, bastante parecidos. La mayoría de los protocolos para la obtención de ADN cromosómico están basados en el método de Marmur (Marmur 1961), en el empleo del Tiocianato de Guanidina (reactivo GES) (Pitcher 1989), o en la utilización de CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) (Wilson 1987, Murray 1980).

#### 1.8.6.1 Análisis con endonucleasas de restricción

Consiste en la digestión del ADN cromosómico con enzimas de restricción, que determina una gran diferencia genómica entre los aislamientos (Langenberg 1986, Majewski 1988). Al separar los fragmentos de ADN en base a su peso molecular, se obtiene un patrón de bandas que proporciona una "huella" o "fingerprint" de los distintos aislamientos. Parece ser altamente discriminatorio para aislamientos de diferentes pacientes, puesto que cada aislamiento presenta un patrón único. El gran número de bandas que se obtiene dificulta su análisis a simple vista, aunque existen sistemas que facilitan su lectura (Owen 1987).

Majewski y Goodwin probaron 9 endonucleasas para analizar el ADN cromosómico de *H. pylori*, pero sólo 3 produjeron una digestión satisfactoria: *HindIII*, *EcoRI* y *SacI*. Las 2 últimas producen pocas bandas de alto peso molecular, lo que dificulta mucho su comparación. *HindIII* produce muchas bandas de bajo peso molecular, que permiten comparaciones más claras entre aislamientos (Majewski 1988). Se han estudiado numerosas enzimas de restricción y actualmente las más empleadas son *HindIII* y *HaeIII* (Simor 1990 b, Morgan 1990, Oudbier 1990, Owen 1990 b, Owen 1991 b). Langenberg y col. encontraron diferencias significativas entre cepas en digestiones con *HindIII* y sugieren este método para estudios epidemiológicos y de tratamiento (Langenberg 1986). Como posible método de tipado para *H. pylori*, es sensible y seguro, pero resulta difícil comparar muchos aislamientos al mismo tiempo, debido a la numerosa cantidad de bandas que se obtiene en la digestión del ADN.

#### 1.8.6.2 Electroforesis en campos pulsados

Para reducir el gran número de bandas producidas en una digestión con un enzima normal, se utilizan enzimas de restricción con pocos puntos de corte; los fragmentos obtenidos se analizan mediante electroforesis en campos pulsados. Hay pocos estudios realizados en *H. pylori*, pero parece que se consiguen buenos resultados (Cantor 1988, Taylor 1991). Los patrones de restricción que se observan con este método son menos complejos que los obtenidos con enzimas de restricción normales, pero más que los obtenidos por ribotipia. Estos estudios confirman la gran diversidad genética entre los aislamientos de *H. pylori* (Dunn 1993, Hirschl 1994, Takami 1994).



### 1.8.6.3 Hibridación

Los fragmentos detectados por el análisis del cromosoma de *H. pylori* con enzimas de restricción es muy numeroso. Los estudios han ido dirigidos a reducir el número de bandas que se observan, para facilitar la comparación de resultados (Owen 1989 c). Uno de los métodos más utilizados ha sido la transferencia del ADN digerido a una membrana de nylon o nitrocelulosa y la hibridación con diferentes tipos de sondas, incluyendo secuencias de ADN al azar, secuencias de genes que codifican productos bacterianos específicos, secuencias de ARNr aisladas a partir de *E. coli* (Morgan 1990, Owen 1991 a, Owen 1991 b, Rautelin 1994) o de *H. pylori*, sondas de fragmentos de ADN recombinante de *H. pylori* (Grimmot 1986, Morotomi 1989, Clayton 1989, Owen 1991 b, Tee 1992, Stanley 1992), o una sonda del gen de la ureasa de *H. pylori* (Tonokatsu 1994). Las sondas han sido marcadas radiactivamente o con marcaje no radiactivo, como biotina, digoxigenina o compuestos fluorados (Wetherall 1988). Se considera que la ribotipia (hibridación con una sonda de ARNr de *E. coli*) es un método sensible, estable y adecuado para la identificación de los aislamientos de *H. pylori* (Morgan 1990), para su utilización en los estudios epidemiológicos y para estudiar el seguimiento después del tratamiento, en los pacientes infectados por este microorganismo. Tiene la ventaja de ser una sonda universal que puede utilizarse en diferentes tipos de organismos, aplicando la misma metodología, pero tiene como desventaja que es una técnica cara y se necesita mucho tiempo para su realización.

### 1.8.7 Métodos de tipado basados en RCP

Los métodos de tipado basados en RCP ofrecen una alternativa atractiva a los métodos de "fingerprinting" cromosómicos clásicos, porque son más sensibles y rápidos y necesitan mucha menor cantidad de ADN. Existen 2 posibles formas de aplicación de la RCP:

#### 1.8.7.1 Amplificación específica y digestión con enzimas de restricción

Amplificación de un fragmento grande del genoma de *H. pylori*, que posteriormente va a ser digerido con enzimas de restricción, mostrando un patrón de bandas característico de cada aislamiento, aunque existen todavía relativamente pocos estudios realizados (Foxall 1992, Akopyanz 1992 a, Moore 1993). Pueden amplificarse fragmentos específicos, como el de la proteína de 48 kDa y el del antígeno de 26 kDa (O'Toole 1992), que pueden digerirse con diferentes enzimas. También se ha amplificado un fragmento grande de la región *ureC* (Fujimoto 1994) o un producto de los genes *ureA* y *ureB* (Owen 1994). Este método se ha utilizado para estudiar aislamientos de *H. pylori*, obtenidos a partir de pacientes en diferentes fases del tratamiento (Clayton 1991 b), y ha permitido detectar infecciones mixtas por más de un tipo de aislamiento de *H. pylori* de forma simultánea (Hurtado 1994 c). Se han probado dobles digestiones de productos amplificados separadamente o análisis de restricción de productos amplificados en múltiples RCPs, obteniéndose patrones 100% discriminatorios (Clayton 1993). Se han detectado evidencias de diversidad dentro del gen de la ureasa (Foxall 1992). Los patrones son mucho más fáciles de comparar que los obtenidos con enzimas de restricción del ADN genómico completo.

### 1.8.7.2 Amplificación inespecífica

Se incluye en la reacción un solo tipo de iniciador inespecífico, generalmente de pequeño tamaño (Akopyanz 1992 b).

Este sistema de tipado basado en la RCP supone un avance considerable, ya que incluso puede utilizarse ADN preparado por ebullición, en vez de la laboriosa preparación y purificación del ADN genómico, que se requiere para el análisis estándar del ADN de *H. pylori* (Owen 1990 b, Owen 1991 b).

Con este método se detecta frecuentemente un polimorfismo en el número y tamaño de las bandas entre los productos amplificados, que es útil como marcador genético. Es un método fácil, rápido, no requiere unos iniciadores específicos para cada especie y no necesita conocimiento del genoma de la bacteria que se va a estudiar.

En resumen, se han utilizado numerosos métodos de tipado para comparar un pequeño número de aislamientos de *H. pylori*, que permiten diferenciar si los aislamientos son idénticos o no; sin embargo, hasta el momento, no se ha encontrado un método que sea utilizado de manera amplia en estudios a gran escala (Dunn 1993). La gran homogeneidad fenotípica que presentan, junto con la gran heterogeneidad genotípica, dificultan el desarrollo de un método de tipado simple.

## 1.9 ACTIVIDAD "in vitro"

La actividad "in vitro" de diferentes antimicrobianos frente a este microorganismo se detalla a continuación:

**1.9.1 Betalactámicos.** Los betalactámicos muestran en general buena actividad "in vitro" (McNulty 1988), siendo penicilina y amoxicilina los más eficaces (Lambert 1986, Goodwin 1986 b, McNulty 1988). Amoxicilina es más estable en medio ácido que penicilina y alcanza mayores concentraciones en tejidos después de una dosis oral, por lo que parece el mejor antibiótico betalactámico para tratar esta infección. No se han detectado hasta el momento ninguna cepa resistente a este betalactámico.

**1.9.2 Macrólidos.** Los macrólidos muestran una excelente actividad "in vitro" (Czinn 1986 b, García Rodríguez 1989, Fiese 1990, Foulds 1990), aunque los más antiguos, como eritromicina, josamicina y espiramicina, no han demostrado eficacia en erradicar *H. pylori* de la mucosa gástrica en ensayos clínicos (McNulty 1986).

Claritromicina tiene alta estabilidad ácida y alta concentración en tejidos, además de una excelente actividad "in vitro" (López-Brea 1993 c). Actualmente se considera como un buen tratamiento para erradicar este microorganismo, aunque durante o después de su uso como monoterapia se puede desarrollar resistencia en aproximadamente 1/5 de los pacientes (probablemente esta es la causa de los fallos clínicos) (Peterson 1992).

**1.9.3 Quinolonas.** El rango inhibitorio de quinolonas, como ciprofloxacino y ofloxacino, frente a *H. pylori* es similar a betalactámicos y macrólidos (McNulty 1988). Sin embargo, no se ha observado eficacia clínica con las que se han utilizado hasta ahora (McNulty 1986).

**1.9.4 Nitrofuranos.** Los nitrofuranos tienen también buena actividad frente a *H. pylori* con CMI<sub>90</sub> de 0.25 mg/l (Howden 1986, McNulty 1988).

**1.9.5 Tetraciclina.** Tetraciclina presenta buena actividad "in vitro" (Lambert 1986, Goodwin 1986 b, McNulty 1988) y se correlaciona con los resultados clínicos, aunque no puede utilizarse en enfermos pediátricos (Pavicic 1993).

**1.9.6 Nitroimidazoles.** Metronidazol es un antibiótico ampliamente utilizado en el tratamiento de la infección por *H. pylori*, administrado en pauta triple con amoxicilina y sales de bismuto, porque presentan una alta tasa de erradicación. Sin embargo, la tasa de resistencia a metronidazol, que varía dependiendo de las poblaciones estudiadas (Becx 1990, Glupzcynski 1990, López-Brea 1991), dificultan su utilización y hace necesaria la realización de pruebas de sensibilidad para conocer la resistencia o no de cada aislamiento clínico (López-Brea 1991, López-Brea 1992).

**1.9.7 Otros antibióticos.** Otros antibióticos como rifampicina, aminoglucósidos, etc. también han sido estudiados "in vitro" y muestran buena actividad (Czinn 1986 b, Lambert 1986, Goodwin 1986 b), aunque no se ha encontrado correlación con los

resultados clínicos (Van Caekenberghe 1987, Loo 1992).

Todos los aislamientos de *H. pylori* son resistentes a vancomicina y anfotericina B (McNulty 1988, Lambert 1986, Goodwin 1986 b) y la mayoría resistentes a polimixina ( $\text{CMI}_{90} > 128 \text{ mg/l}$ ). Cefsulodina es menos activa que otras cefalosporinas con CMI de más de 8 mg/l. Por lo tanto, vancomicina, anfotericina B y cefsulodina pueden ser utilizadas en los medios selectivos de aislamiento de estos organismos. Todas las cepas de *H. pylori* son también resistentes a trimetoprim y sulfametoxazol, con  $\text{CMI} > 256 \text{ mg/l}$ , como microorganismos del género *Campylobacter* (Svedhem 1991). Estos compuestos pueden ser utilizados como agentes selectivos en los medios de cultivo, de forma similar a como se realiza para especies de *Campylobacter* (Skirrow 1977).

**1.9.8 Compuestos no antibióticos.** Diversos autores han estudiado el efecto antibacteriano de fármacos no antibióticos utilizados en el tratamiento de gastritis y úlcera, como antiácidos, antagonistas de receptores  $\text{H}_2$ , inhibidores de la bomba de protones, etc (Glupczynski 1988 b, Kristiansen 1989).

Las sales de bismuto tienen actividad "in vitro" frente a *H. pylori*, a las concentraciones alcanzables en la mucosa gástrica (Goodwin 1988 a). Las sales de bismuto usadas como único agente pueden conseguir un 20% de erradicación a largo plazo, pero esta tasa aumenta espectacularmente, pudiendo llegar hasta el 80% si se administra junto con antibióticos.

La  $\text{CMI}_{90}$  de los antagonistas de receptores de  $\text{H}_2$  como carbenoxolona, ranitidina y sucralfato, es  $> 1000 \text{ mg/l}$ , pero pueden tener efecto a través de

mecanismos "in vivo", como inhibir la adherencia a la mucosa gástrica (Goodwin 1993 b), simplemente aumentando el pH y permitiendo que actúen los antibióticos (Konturek 1991, Dettmer 1994) o por otros posibles mecanismos todavía en estudio (Anglada 1988, Marotta 1994). La sofalcona, sustancia utilizada en Japón, tiene actividad frente a *H. pylori* con CMI<sub>90</sub> de 50 mg/l, e inhibidores de la ureasa, como el ácido acetohidroxámico, también posee efecto inhibitorio y bactericida frente a *H. pylori* (García Rodríguez 1989, Goodwin 1993 b, Phillips 1993).

Omeprazol, un inhibidor de la bomba de protones de las células parietales gástricas de mamíferos (Mainguet 1989, Maton 1991) tiene actividad "in vitro" frente a *H. pylori* con CMI<sub>90</sub>s de 128 mg/l, 32 mg/l o 16 mg/l, dependiendo de los trabajos consultados (Biasco 1989, Loo 1992, López-Brea 1993 d, Rubinstein 1994). Lansoprazol o pantoprazol, inhibidores también de la bomba de protones, están siendo estudiados como tratamientos futuros para erradicar *H. pylori*, y parecen tener buena actividad "in vitro" frente a *H. pylori* (Iwahi 1991, Louw 1994, Fujiyama 1994).

La investigación en este campo, se está desarrollando con la búsqueda de nuevas moléculas, como la GR-122311X (ranitidina/citrato de bismuto), con propiedades antisecretoras, citoprotectoras y anti-*Helicobacter* (Webb 1994 b, McLaren 1994).

## 1.10 DESARROLLO DE RESISTENCIA

Uno de los mayores problemas en el tratamiento de la infección por *H. pylori* es la aparición de mutantes resistentes durante el tratamiento con agentes presumiblemente adecuados.

Los estudios realizados sobre la frecuencia y el nivel de resistencia "in vitro" pueden ser de importancia en el tratamiento, debido a que existe una buena correlación entre los resultados obtenidos "in vitro" e "in vivo" (Haas 1990).

Se han publicado trabajos sobre la aparición de resistencia a ciprofloxacino, otras quinolonas (Hirschl 1988 b, Mertens 1989), rifampicina (Hirschl 1988 b) y otros antibióticos durante el tratamiento con monoterapia (Stone 1988, Hirschl 1988 b). Asimismo, se ha descrito de manera anecdótica la aparición de resistencia a clindamicina y cefixima (Loo 1992, Goodwin 1993 b).

Existen muchas publicaciones sobre la resistencia adquirida a imidazoles, especialmente metronidazol (Hirschl 1988 b, Goodwin 1988 b, Biasco 1989). La tasa de resistencia varía entre el 12 y el 84 %, según la población estudiada (McNulty 1985 a, Goodwin 1988 b, Glupczynski 1990, Gasperoni 1991, López-Brea 1991, Parasakthi 1992, López-Brea 1992 b, Rautelin 1992, Loo 1992, European Study Group 1992, Tucci 1993, López-Brea 1995 b,).

Algunos autores observan que la tasa de erradicación es significativamente mayor en los pacientes infectados con cepas sensibles a metronidazol, al inicio del tratamiento, que en los infectados con cepas resistentes (Bell 1992, Lian 1993). Sin



---

embargo, otros autores observan tasas de erradicación aceptables en pacientes con aislamientos resistentes a metronidazol (Glupczynski 1992 b, Rautelin 1992).

El porcentaje de resistencia a macrólidos permanece muy bajo en la mayoría de los países, aunque en algunos, como Francia, es elevado (Cayla 1993, López-Brea 1995 b), y en otros, está apareciendo o aumentando recientemente (López-Brea 1995 a, Glupczynski 1995 a).

## 1.11 TRATAMIENTO

El tratamiento de la infección por *H. pylori* va encaminado a conseguir su erradicación de la mucosa gástrica, y actualmente está basado en el uso de antibióticos asociados con sales de bismuto, antagonistas de los receptores  $H_2$  o inhibidores de la bomba de protones. La conferencia de consenso del "US National Institute of Health" recomendó recientemente el tratamiento con antibióticos de todos los pacientes con úlcera, infectados por *H. pylori* (Yamada 1994).

El tratamiento con sales de bismuto (120 mg/6 h), metronidazol (250 mg/6 h) y amoxicilina (500 mg/6 h) o tetraciclina (500 mg/6 h) durante 14 días parece ser adecuado (López-Brea 1992 a). Sin embargo, presenta efectos secundarios y es difícil de cumplir por la elevada dosificación.

Omeprazol (20 mg/12 h) asociado a amoxicilina (500 mg/6 h) o a claritromicina (500 mg/12 h) es un tratamiento eficaz para erradicar la infección producida por *H. pylori*. Se han probado también tratamientos triples con omeprazol, claritromicina y amoxicilina o metronidazol (Labenz 1994, Dal Bo 1994), obteniéndose buenos resultados, aunque pueden aumentar los efectos secundarios.

Hentscheld ha estudiado la asociación de ranitidina (un antagonista de los receptores  $H_2$ ) con amoxicilina y metronidazol, consiguiendo también buenas tasas de erradicación (Hentscheld 1993).

Se están buscando tratamientos alternativos a la terapia triple, que produzcan menos efectos secundarios, faciliten el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente, puedan ser utilizados en pacientes alérgicos a betalactámicos y en pacientes con cepas de *H. pylori* resistentes a metronidazol.

## 1.12 DESARROLLO DE UNA VACUNA

El reconocimiento de *H. pylori* como el agente etiológico de la gastritis crónica activa, ha producido un cambio progresivo en el enfoque de la úlcera péptica, que se reconoce cada vez más como una enfermedad infecciosa. Después de la erradicación del microorganismo de la mucosa gástrica, se produce curación de la gastritis crónica (Valle 1991, Jaskiewicz 1993), y la tasa de recaída de la úlcera péptica disminuye drásticamente (Forbes 1994). La prevalencia de esta infección es alta, especialmente en países en desarrollo, y los tratamientos erradicadores son caros, complicados, asociados con efectos secundarios y no siempre efectivos. Por otra parte, la infección durante largos períodos de tiempo por *H. pylori* es un importante factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico y de linfomas de las células B-gástricas. Muchas veces la infección por *H. pylori* es prácticamente asintomática hasta que las complicaciones se hacen patentes. Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna podría ser la mejor opción para prevenir las manifestaciones de la infección por *H. pylori* (Michetti 1994).

Si se pudiera desarrollar una vacuna para la infección por *H. pylori*, se podrían prevenir casi todas las úlceras duodenales, un alto porcentaje de los casos de cáncer gástrico y de úlcera gástrica, además de muchos casos de gastritis. El éxito del desarrollo de una vacuna implica los siguientes puntos: (a) identificación de los factores del huésped, celulares y humorales, que confieren protección, (b) selección de las cepas bacterianas y los epítomos que estimulan los factores del huésped, (c) probar la vacuna en un modelo animal, (d) probar la vacuna en humanos. Idealmente una vacuna debe

proteger después de una vacunación oral.

Actualmente, empieza a ser posible probar una vacuna frente a *H. pylori* en modelos animales. *H. felis* puede ser un modelo válido en el ratón (Lee 1990, Czinn 1991). Pero debe evaluarse en el futuro si sirve para extrapolar lo que ocurre con la vacuna de *H. pylori* en humanos. *H. mustelae* puede ser también un modelo en hurones (Fox 1990), especialmente cuando se estudian los mecanismos de adherencia. Además, será necesario realizar estudios en chimpancés y monos para probar la vacuna, ya que los epítomos de *H. pylori* pueden no ser completamente válidos en otros modelos. Algunos investigadores han infectado mono rhesus con cepas de *H. pylori* de origen humano (Baskerville 1988 b); sin embargo, otros no lo han conseguido con los de origen humano y sí con los de origen rhesus (Euler 1990).

La eficacia de una vacuna frente a esta infección parece difícil porque la inmunización natural no es adecuada para eliminarla, a pesar de que se produce una importante respuesta inmune, tanto a nivel local como sistémico (Jaskiewicz 1993). Sin embargo, recientemente se ha demostrado la inmunización oral de ratones, con lisados de *H. felis*, y se ha visto que induce protección, asociada con los altos niveles de anticuerpos IgA (Czinn 1993, Chen 1993). A partir de estos resultados, se está dedicando un mayor esfuerzo para desarrollar el sistema de vacuna apropiado para estimular la inmunidad adecuada y en el sitio adecuado (Michetti 1994). También parece que la inmunización sirve como tratamiento de la infección por *H. pylori* (Doidge 1994, Corthésy-Theulaz 1994). El tiempo y la futuras investigaciones confirmarán si puede ser realidad el prevenir las enfermedades gástricas.

La sofisticada biología molecular que se aplica actualmente y la meticulosa

---

incorporación de todos los factores conocidos sobre patogénesis, deben asegurar una producción progresiva de una vacuna eficiente y no peligrosa (Goodwin 1993 a). La patogénesis de la infección por *H. pylori* está siendo cada vez más comprendida. La identificación de factores de virulencia en este microorganismo, como la ureasa o la toxina vacuolizante, llevará a la posibilidad de utilizarlos como antígenos protectores en modelos animales. Actualmente se está desarrollando un ensayo clínico en fase I, en Suiza, con la ureasa, pero probablemente la vacuna más segura incluiría más de 1 tipo de antígenos (Ghiara 1995). Los próximos años nos dirán si realmente es posible vacunar de forma eficaz para prevenir y tratar la enfermedad producida por *H. pylori* en humanos.

## **2. OBJETIVOS**

- 
- 1.- Identificar los genes *ureA*, *ureB* y *ARNr* en 25 aislamientos clínicos de *H. pylori* mediante RCP y determinar la concentración de ADN que detecta cada protocolo.
  - 2.- Comparar un método molecular (RCP con iniciadores *ureA*) para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* a partir de muestras de biopsia gástrica, con los métodos de diagnóstico habituales (histología y cultivo).
  - 3.- Estudiar diferentes características bioquímicas, de sensibilidad y de virulencia en aislamientos clínicos de *H. pylori*.
  - 4.- Valorar diversos métodos fenotípicos y genotípicos para diferenciar los distintos aislamientos de *H. pylori*, obtenidos a partir de muestras del mismo paciente, en diversas fases del tratamiento.
  - 5.- Utilizar métodos fenotípicos y genotípicos para comparar aislamientos de *H. pylori* de la misma biopsia, con diferencias morfológicas o de sensibilidad.
  - 6.- Aplicar métodos de tipado a aislamientos clínicos de *H. pylori*, procedentes de pacientes no relacionados.
  - 7.- Comparar los presupuestos de 5 métodos de tipado, en cuanto a su relación coste/beneficio (1 método fenotípico y 4 genotípicos).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1 PACIENTES Y AISLAMIENTOS ESTUDIADOS

Se estudiaron muestras de biopsia gástrica de pacientes pediátricos, sometidos a endoscopia. Los niños acudían a la consulta de digestivo por presentar de diferentes síntomas. En una serie de 136 niños, de 2 a 18 años de edad (67 niños y 69 niñas), con gastritis antral causada por *H. pylori*, diagnosticada por histología y/o cultivo, encontramos los siguientes síntomas, hallazgos endoscópicos e histológicos (Martínez Gómez 1994).

Sintomatología en los 136 niños	nº	%
Dolor epigástrico	126	92.6
Vómitos	50	36.7
Anorexia	23	16.9
Pérdida de peso	16	11.7
Pirosis	13	9.5
Ferropenia	3	2.2

Estudios endoscópicos	nº	%
Antritis nodular	90	66.1
Eritema puntiforme en antro	36	26.5
Aspecto normal	7	5.1
Gastritis erosiva	3	2.2
Úlcera	12	8.8
Duodenitis	27	19.8

Hallazgos histológicos	nº	%
Gastritis crónica antral superficial no activa	89	65.4
Gastritis crónica antral superficial activa	38	27.9
Gastritis crónica difusa	6	4.4
Gastritis linfocítica	3	2.2

Las muestras de biopsias fueron procesadas para estudio histológico y cultivo microbiológico, y conservadas a -70°C hasta la realización del estudio molecular. A los niños se les administró un tratamiento con subcitrato de bismuto (250 mg/12 h) y amoxicilina (50 mg/kg/día) o metronidazol (20 mg/kg/día), 15 días cada uno. Se realizó un estudio para detectar las posibles re-infecciones y/o recaídas, después de 1, 6 y 12 meses de terminar el tratamiento.

### **3.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO HABITUALES**

#### **3.2.1 ESTUDIO HISTOLÓGICO**

Los estudios histológicos se llevaron a cabo mediante tinción de Giemsa. La presencia de *H. pylori* en las muestras se clasificó de 1 a 3 +, dependiendo de la cantidad de microorganismos observados.

#### **3.2.2 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO**

##### **3.2.2.1 TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS**

Las biopsias de antro gástrico, obtenidas mediante endoscopia digestiva, fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología lo más rápidamente posible. El trozo de biopsia iba colocado sobre la pared de un tubo estéril, con 1 ml de solución salina, para evitar su desecación. La muestra fue procesada antes de que transcurrieran 4 h desde que se realizó la endoscopia.

##### **3.2.2.2 PROCESAMIENTO DE LAS BIOPSIAS**

Las muestras eran recogidas con una torunda estéril y sembradas sobre dos placas de agar Columbia con 5% de sangre de carnero; una placa era incubada en una estufa con 5% de CO<sub>2</sub> y la otra, en atmósfera microaerofílica. Esta atmósfera puede obtenerse de dos formas: a) una jarra para cultivo de anaerobios con un sobre de microaerofilia Campy-Pack (BECTON DICKINSON) con catalizador de paladio, o b) con un sobre Gas-Pack para atmósfera anaeróbica sin catalizador (BECTON

DICKINSON). También se incluyó un medio de cultivo selectivo incubado en atmósfera de CO<sub>2</sub>, que fue Agar CAMPYLOBACTER o agar PYLORI (BioMerieux), dependiendo del suministro disponible en el laboratorio en cada temporada.

Las muestras cultivadas eran observadas cada 48 h, durante 7 a 14 días, para detectar el crecimiento de colonias pequeñas y brillantes.

### 3.2.2.3 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

Las colonias susceptibles de ser *H. pylori* se sub-cultivaron en un medio de agar Columbia, con 5 % de sangre de carnero, y se identificaron según metodología estándar: morfología de la colonia, tinción de Gram y pruebas positivas de ureasa, catalasa y oxidasa (Goodwin 1990).

### 3.2.2.4 CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Todos los aislamientos se mantuvieron congelados en caldo de Tripticasa Soja (TSB), con 15 % de glicerol, a -70°C y en nitrógeno líquido.

Cuando el cultivo era requerido para próximos estudios, el tubo con caldo TSB era descongelado, aproximadamente 0.5 ml de caldo sembrado sobre una placa de agar sangre, e incubado de 2 a 7 días en una estufa de CO<sub>2</sub>, hasta obtener el crecimiento del microorganismo y, a partir de ese momento, subcultivados cada 48 h o 4 días en placas de agar sangre.

### 3.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULARES

#### 3.3.1 METODOLOGÍA EMPLEADA

##### 3.3.1.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN

Se realizó la extracción de ADN según el método del CTAB, previamente publicado (Wilson 1987), que consistía en:

- 1.- Disolver en 1 ml de tampón TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) el contenido de 1 ó 2 placas de un aislamiento reciente (48 h) de *H. pylori* con un asa de siembra.
- 2.- Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 12.000 rpm, eliminar el sobrenadante y añadir 567  $\mu$ l de tampón TE, 30  $\mu$ l de SDS al 10% y 3  $\mu$ l de proteinasa K (concentración final de 100  $\mu$ g/ml). Mezclar bien e incubar a 37°C durante 1 hora.
- 3.- Añadir 100  $\mu$ l de 5M NaCl, 80  $\mu$ l de la solución NaCl/CTAB (10% CTAB en 0.7 M NaCl), mezclar bien e incubar a 65°C durante 10 minutos.
- 4.- Añadir 0.7 a 0.8 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), mezclar, centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm y separar el sobrenadante (fase acuosa) en un tubo nuevo. Añadir fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar y volver a centrifugar.
- 5.- Separar el sobrenadante en un tubo nuevo y añadir 0.6 volúmenes de isopropanol para que precipiten los ácidos nucleicos. Mover el tubo suavemente hasta que el precipitado se vuelva claramente visible. El precipitado puede transferirse a un nuevo tubo o dejarlo precipitar a -20°C durante 1 hora.
- 6.- Centrifugar y lavar el precipitado de ADN con 1.5 ml de etanol al 70%. Eliminar el sobrenadante y secar a 37°C. Re-suspender el sedimento en 100  $\mu$ l de tampón TE y medir la cantidad y la calidad del ADN mediante lectura de la densidad óptica.

### 3.3.1.2 MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN

Debido a la gran cantidad de protocolos que existen en la literatura, aplicables al diagnóstico de la infección por *H. pylori*, seleccionamos algunos de ellos que nos parecían fiables, porque habían sido utilizados por diferentes equipos de investigadores de reconocido prestigio internacional en este tema.

Utilizamos un protocolo de amplificación de la  $\beta$ -globina humana, para confirmar que las muestras de biopsia no contenían sustancias inhibidoras de la reacción de RCP y que el proceso de extracción había sido adecuado.

En las tablas 1 a 4 se encuentran las condiciones utilizadas en cada protocolo de RCP.

Se estudiaron 3 tipos de iniciadores en la detección de *H. pylori*. Los iniciadores usados eran secuencias utilizadas por otros autores, que detectaban un fragmento amplificado de 411 pb del gen de la sub-unidad A de la ureasa (*ureA*) (Clayton 1992), uno de 933 pb del gen de la sub-unidad B de la ureasa (*ureB*) (Clayton 1992), y uno de 500 pb de un gen conservado de la sub-unidad 16S del *ARNr* (*ARNr*) (Engstrand 1992).

Se utilizó un volumen de reacción de 50  $\mu$ l, con 1.25 U de Taq ADN polimerasa (Promega), en el tampón de reacción recomendado por el fabricante y con las condiciones descritas en las tablas siguientes.

Tabla 1. Protocolo de RCP para detectar el gen *ARNr* (Engstrand 1992).

Secuencia de los iniciadores	P1: 5'-TGG-CAA-TCA-GCG-TCA-GGT-AAT-G-3'	
	P2: 5'-GCT-AAG-AGA-TCA-GCC-TAT-GTC-C-3'	
Condiciones de la reacción	Reactivo	Concentración
	P1	0.4 $\mu$ M
	P2	0.4 $\mu$ M
	dNTPs	0.2 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Ciclos de amplificación	desnaturalización inicial	94°C 5 min
	nº ciclos	39
	desnaturalización	94°C 50 seg
	hibridación	55°C 50 seg
	extensión	72°C 50 seg
	extensión final	72°C 5 min
Tamaño del producto amplificado		500 pb

Tabla 2. Protocolo de RCP para detectar el gen *ureA* (Clayton 1992)

Secuencia de los iniciadores	HPU1: 5'GCC-AAT-GGT-AAA-TTA-GTT-3'	
	HPU2: 5'CTC-CTT-AAT-TGT-TTT-TAC-3'	
Condiciones de la reacción	Reactivo	Concentración
	HPU1	0.5 $\mu$ M
	HPU2	0.5 $\mu$ M
	dNTPs	0.2 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Ciclos de amplificación	desnaturalización inicial	94°C 2 min
	nº ciclos	38
	desnaturalización	94°C 1 min
	hibridación	45°C 1 min
	extensión	72°C 1 min
	extensión final	72°C 5 min
Tamaño del producto amplificado		411 pb



Tabla 3. Protocolo de RCP para detectar el gen *ureB* (Clayton 1992)

Secuencia de los iniciadores	HPU50: 5'-GAA-CAT-GAC-TAC-ACC-AT-3'	
	HPU25: 5'-TGG-TTT-GAG-GGC-GAA-TC-3'	
Condiciones de la reacción	Reactivo	Concentración
	HPU50	0.5 $\mu$ M
	HPU25	0.5 $\mu$ M
	dNTPs	0.2 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Ciclos de amplificación	desnaturalización inicial	94°C 2 min
	nº ciclos	38
	desnaturalización	94°C 50 seg
	hibridación	50°C 50 seg
	extensión	72°C 50 seg
	extensión final	72°C 5 min
Tamaño del producto amplificado		933 pb

Tabla 4. Protocolo de RCP para detectar el gen de la  $\beta$ -GLOBINA de células de mamíferos (Bauer 1993).

Secuencia de los iniciadores	GH20: 5'-GAA-GAG-CCA-AGG-ACA-GGT-AC-3'	
	PCO4: 5'-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3'	
Condiciones de la reacción	Reactivo	Concentración
	GH20	40 nM
	PCO4	40 nM
	dNTPs	0.2 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Ciclos de amplificación	desnaturalización inicial	94°C 5 min
	nº ciclos	39
	desnaturalización	94°C 50 seg
	hibridación	55°C 50 seg
	extensión	72°C 50 seg
	extensión final	72°C 5 min 72°C 50 seg
Tamaño del producto amplificado		268 pb

### 3.3.1.3 LECTURA DE RESULTADOS

Los fragmentos de ADN amplificados se separaron en función de su peso molecular en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando cubetas de electroforesis horizontales y una fuente de alimentación que permite mantener un voltaje de 80 V durante 2 horas. La muestra amplificada se diluía con un 5% del tampón de carga, que contenía azul de bromofenol, y se colocaba sobre el pocillo del gel. Se utilizó, como patrón de peso molecular, el marcador  $\lambda$ -ADN digerido con *Hind*III o  $\phi$ X 174 digerido con *Hae*III. En el momento de preparar el gel de agarosa, se incorporó bromuro de etidio hasta obtener una concentración final de 1  $\mu$ g/ml. El gel se observó en un transiluminador de luz UV y se realizó una fotografía mediante una cámara Polaroid MP4 con un filtro adecuado y una película fotográfica 667.

### 3.3.2 COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS

Para estudiar qué protocolo detectaba la menor cantidad de ADN de *H. pylori*, se preparó una serie de concentraciones decrecientes de ADN (de 200, 100, 50, 25 y 12,5 pg), a partir de 3 aislamientos clínicos (números 130, 170 y 149) y se utilizó, como control positivo, el mismo ADN pero a una concentración mayor (5 ng).

### 3.3.3 RCP A PARTIR DE COLONIAS AISLADAS

Se procesaron 25 aislamientos clínicos de *H. pylori*, obtenidos a partir de biopsias, para extraer su ADN. Cinco  $\mu$ l del ADN obtenido fueron utilizados para amplificar los 3 tipos de genes. Los aislamientos incluidos en esta parte del estudio se encuentran en la tabla 5.

Tabla 5. Aislamientos clínicos de *H. pylori* probados para estandarizar la técnica de la RCP con los diferentes tipos de iniciadores (x = prueba realizada, - = no realizada).

nº	iniciales paciente	RCP <i>ureA</i>	RCP <i>ureB</i>	RCP <i>ARNr</i>
16	CGS	x	x	x
116	FPC	x	x	x
121	VRM	x	x	x
122	JCLR	x	x	x
130	RTS	x	x	x
144	SC	x	x	x
149	LP	x	x	x
166	TGH	x	x	x
219	SFL	x	x	x
348	JFG	x	x	x
426	FMR	x	x	x
440	SA	x	x	x
463	MAT	x	x	x
534	MMA	x	x	x
537	NFG	x	x	x
558	LCP	x	x	-
560	JFRM	x	x	x
568	FBG	x	x	x
585	EGM	x	x	x
590	CGS	x	x	x
604	CUA	x	x	x
605	ASF	x	x	x
613	ABCR	x	x	x
614	JAHM	x	x	x
620	SGB	x	x	-

### 3.3.4 RCP A PARTIR DE BIOPSIAS

Se estudiaron un total de 57 muestras de biopsia gástrica, que fueron conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar el protocolo de extracción. La muestra de biopsia fue triturada con un homogeneizador de cristal de pequeño tamaño o troceada todo lo posible con un bisturí estéril, en un volumen de  $200\ \mu\text{l}$  de solución salina. A partir de ese momento, se realizó el mismo protocolo que el utilizado para los aislamientos en cultivo. Cinco  $\mu\text{l}$  del ADN purificado, se amplificaron en las condiciones de reacción explicadas anteriormente. Los pacientes incluidos en esta parte del trabajo se encuentran en la tabla 6.

En primer lugar, se realizó una RCP del gen *ureA*, incluyendo un control positivo y uno negativo, para comprobar que no existía contaminación. Si en algún caso los resultados obtenidos en el control positivo o negativo no eran los esperados, la RCP se consideró no válida y se repitió el proceso.

El ADN obtenido de la biopsia era utilizado para la RCP en tres condiciones: sin diluir o diluido 1:10 y 1:100.

En todas las muestras que dieron negativas para la RCP del gen *ureA*, se confirmó que la reacción no estaba inhibida o que el ADN no se encontraba en mal estado, mediante una prueba de RCP para detectar el gen de la  $\beta$ -globina humana, que amplifica el ADN presente en las células de la biopsia. En todos los casos en los que la RCP-*ureA* era negativa, la RCP de la  $\beta$ -globina era positiva.

Tabla 6. Pacientes incluidos en el estudio de técnicas moleculares para diagnóstico de la infección por *H. pylori* (x = prueba realizada, - = no realizada, A = antes, B1 = 1 mes después y B12 = 1 año después de terminar el tratamiento).

Nº	NOMBRE	FECHA	BIOP	CULT	HIST	RCP <i>ureA</i>	RCP <i>βglo</i>
451	CMQ	18-2-94	A	x	x	x	-
461	EGL	11-3-94	B1	x	x	x	-
463	MAT	11-3-94	A	x	x	x	-
468	EMG	11-3-94	B12	x	x	x	-
469	JAH	18-3-94	A	x	x	x	-
495	JHZ	25-4-94	A	x	x	x	x
496	RGM	25-4-94	A	x	-	x	-
504	RHF	6-5-94	A	x	x	x	x
505	VSG	6-5-94	A	x	x	x	x
512	CMC	27-5-94	A	x	x	x	x
546	AR	? -9-94	A	x	-	x	x
547	BCJ	? -9-94	A	x	x	x	x
549	AFG	23-9-94	A	x	-	x	x
550	LCP	23-9-94	B1	x	-	x	-
551	JBB	23-9-94	A	x	x	x	x
553	AGS	10-10-94	A	x	-	x	-
554	PPI	10-10-94	A	x	x	x	x
555	GPC	10-10-94	A	x	x	x	x
556	JRB	10-10-94	A	x	-	x	x
557	MCM	2-10-94	B1	x	x	x	-
558	ASF	2-10-94	A	x	x	x	-
559	RVF	2-10-94	B1	x	-	x	x
560	JFRM	2-10-94	B12	x	x	x	-
561	HAGP	28-10-94	?	x	x	x	x
562	MCB	28-10-94	?	x	x	x	-
563	MMB	28-10-94	?	x	-	x	x
564	AHB	28-10-94	?	x	x	x	x
565	PPT	28-10-94	?	x	x	x	x
566	LPL	28-10-94	A	x	x	x	x

Tabla 6 (cont)

Nº	NOMBRE	FECHA	BIOP	CULT	HIST	RCP <i>ureA</i>	RCP <i>βglo</i>
567	IRC	28-10-94	?	x	-	x	x
568	FBG	4-11-94	?	x	x	x	-
569	NLA	4-11-94	?	x	x	x	-
570	DRS	4-11-94	?	x	x	x	x
571	FHS	18-11-94	B12	x	x	x	-
572	LMM	18-11-94	A	x	x	x	x
573	IPR	18-11-94	A	x	x	x	x
574	CAU	18-11-94	A	x	x	x	-
575	MJBL	18-11-94	A	x	x	x	x
576	DGD	18-11-94	A	x	x	x	x
577	AFC	25-11-94	A	x	x	x	x
578	SGB	25-11-94	A	x	x	x	x
579	AGB	25-11-94	A	x	-	x	-
580	RJF	25-11-94	A	x	x	x	-
581	AMM	25-11-94	A	x	x	x	x
582	BCJ	25-11-94	B1	x	x	x	-
583	IMH	25-11-94	B12	x	x	x	x
584	JLMF	25-11-94	A	x	-	x	x
585	EGM	2-12-94	A	x	x	x	x
586	EFP	2-12-94	A	x	-	x	x
587	JCM	2-12-94	A	x	-	x	x
588	DFM	16-12-94	A	x	-	x	x
589	JMA	16-12-94	B1	x	x	x	x
590	CGS	16-12-94	B12	x	x	x	x
591	VCM	16-12-94	A	x	x	x	-
592	MCB	16-12-94	B1	x	x	x	x
593	JBB	16-12-94	B1	x	x	x	-
594	BAA	16-12-94	A	x	x	x	-



### 3.4 CARACTERÍSTICAS DE *H. pylori*

Cincuenta aislamientos clínicos de *H. pylori* fueron sometidos a diferentes técnicas para detectar características de sensibilidad, bioquímicas y de virulencia, y se consideraron 3 grupos:

Grupo 1: aislamientos del mismo paciente obtenidos en diferentes fases del tratamiento (19 aislamientos) (tabla 7).

Grupo 2: aislamientos de la misma muestra, con diferencias en la morfología o en la sensibilidad y aislamientos de 2 hermanos (15 aislamientos, 6 de ellos repetidos) (tabla 8).

Grupo 3: aislamientos no relacionados entre ellos (22 aislamientos) (tabla 9).

Los aislamientos del mismo paciente se encuentran separados mediante una raya doble. En algunos casos, un mismo aislamiento puede encontrarse en el Grupo 1 y en el Grupo 2; por lo tanto, siempre que se repiten en el Grupo 2 aparece sombreado.

En las tablas se encuentran las siguientes siglas o abreviaturas:

Tratto: Relación del aislamiento con respecto al tratamiento y puede encontrarse

A: aislamiento obtenido antes de iniciar el tratamiento, B1: obtenidos 1 mes después de terminar el tratamiento, B6: obtenido 6 meses después, B12: 12 meses después y B18: 18 meses después.

Enz. pref. = Presencia de enzimas preformadas mediante el sistema API ZYM

Sensibilidad a MET = metronidazol, AMX = amoxicilina y CLA = claritromicina

mov = movilidad

tox = toxicidad mediante determinación de efecto vacuolizante.

RCPcagA = Detección del gen *cagA* mediante RCP.

Tabla 7. Aislamientos clínicos de *H. pylori* en los que se han estudiado características de sensibilidad, bioquímicas y de virulencia. Grupo 1: Cepas del mismo paciente en diferentes fases del tratamiento (x = prueba realizada, - = no realizada).

nº	Paciente	tratto	Enz pref	Sensibilidad			mov	tox Vero	RCP <i>cagA</i>
				MET	AMX	CLA			
70	ISS	A	x	x	x	x	x	x	-
163	ISS	B6	x	x	x	x	-	-	-
190	ISS	B12	x	x	x	x	x	-	-
286	ISS	B18	-	x	x	-	-	-	-
72	EMG	B1	x	x	x	x	x	x	x
222	EMG	B12	x	x	x	x	x	-	-
468	EMG	B18	-	-	-	-	-	-	-
116	FP	B6	x	x	x	x	-	x	x
188	FP	B12	x	x	x	x	x	-	-
170	EQC	A	x	x	x	x	x	-	x
193	EQC	B1	x	x	x	x	x	-	x
179	ASR	A	x	x	x	x	x	-	x
283	ASR	B6	x	x	x	-	x	-	-
314	ASR	B12	-	x	x	x	-	-	-
301	JRM	B1	x	x	x	x	x	-	x
343	JRM	B12	-	x	x	x	-	-	x
255	JFG	A	x	x	x	-	-	-	x
282	JFG	B1	x	-	-	-	x	-	x
348	JFG	B6	-	x	x	x	-	-	x

Tabla 8. Aislamientos clínicos de *H. pylori* en los que se han estudiado características de sensibilidad, bioquímicas y de virulencia. Grupo 2: Cepas de la misma muestra, con diferencias en la morfología o en la sensibilidad y aislamientos de 2 hermanos (LP y FP) (x = prueba realizada, - = no realizada) (Las casillas sombreadas corresponden a aislamientos repetidos en el Grupo 1 ó 2).

nº	Paciente	trato	Enz. pref.	Sensibilidad			mov	tox Vero	RCP <i>cagA</i>
				MET	AMX	CLA			
16	GS	A	x	x	x	x	-	x	-
16sp	GS	A	-	x	-	x	-	-	-
72	EMG	B1	x	x	x	x	x	x	x
72sp	EMG	B1	-	x	x	x	-	-	-
170	EQC	A	x	x	x	x	x	-	x
170sp	EQC	A	x	x	x	x	x	-	-
193	EQC	B1	x	x	x	x	x	-	x
193sp	EQC	B1	-	x	x	x	-	-	-
130	RTS	A	x	x	x	x	x	-	x
130sp	RTS	A	-	x	x	x	-	-	-
149 P	LP	A	x	x	x	x	x	x	x
149 G	LP	A	x	x	x	-	x	x	-
116	FP	B6	x	x	x	x	-	x	x
188	FP	B12	x	x	x	x	x	-	-
149 G	LP	A	x	x	x	x	x	-	x

Tabla 9. Aislamientos clínicos de *H. pylori* en los que se han estudiado características de sensibilidad, bioquímicas y de virulencia. Grupo 3: Cepas de pacientes no relacionados (x = prueba realizada, - = no realizada).

nº	Enz. prefor.	Sensibilidad			mov	tox Vero	RCP <i>cagA</i>
		MET	AMX	CLA			
15	x	x	x	x	x	-	-
39	x	x	x	x	x	x	x
73	x	x	x	x	x	x	-
83	x	x	x	x	x	x	-
101	x	x	x	-	-	x	-
106	x	x	x	x	x	x	x
121	x	x	x	x	x	x	x
122	x	x	x	x	x	x	x
125	x	x	x	x	-	x	-
156	x	x	x	x	x	-	x
165	-	x	x	x	-	-	-
166	x	x	x	x	x	x	x
174	x	x	x	x	x	-	-
178	x	x	x	x	x	-	x
186	-	x	x	x	-	-	-
197	x	x	x	x	x	-	x
233	x	x	x	x	x	-	x
242	x	x	x	x	x	-	x
248	x	x	x	-	x	-	x
253	x	x	x	x	x	-	-
259	-	x	x	x	-	-	x
305	x	x	x	x	x	-	-

### 3.4.1 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

#### 3.4.1.1 ANTIBIÓTICOS ESTUDIADOS

Los antibióticos estudiados fueron los siguientes: amoxicilina, claritromicina y metronidazol, que se encontraban en forma de sustancia pura valorada. Fueron pesados según la potencia descrita por el fabricante y disueltos en las condiciones apropiadas (Tabla 10).

Tabla 10. Solventes y diluyentes de los antibióticos estudiados		
ANTIBIÓTICOS	SOLVENTE	DILUYENTE
AMOXICILINA	Tampón pH 6	Agua
CLARITROMICINA	Etanol al 95 %	Agua
METRONIDAZOL	DMSO	Agua

#### 3.4.1.2 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó por un método de dilución en agar, usando Mueller-Hinton con 7% de sangre de caballo. Los diferentes compuestos fueron estudiados a concentraciones dobles seriadas desde 128 a 0.008 mg/l. Se inocularon cultivos de 48 h de incubación en caldo Brucella con 10% de suero fetal bovino y se incubaron durante 72 h en una estufa con 5-10% de CO<sub>2</sub>. Un inóculo de 10<sup>6</sup> UFC/ml fue colocado sobre las placas con un replicador de Steer, y éstas fueron incubadas durante 3 días en atmósfera con 5-10% de CO<sub>2</sub>. La CMI se definió como la concentración más baja del antibiótico que inhibe el crecimiento visible.

### 3.4.1.3 PUNTO DE CORTE DE RESISTENCIA

No existen recomendaciones oficiales para utilizar un punto de corte de resistencia o sensibilidad en *H. pylori*. Para metronidazol y claritromicina hemos considerado los criterios que se utilizan con mayor frecuencia por otros equipos, que trabajan en este tema a nivel internacional (HP). Para amoxicilina se han utilizado las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS), aunque no sean específicas de *H. pylori*:

Tabla 11. Criterios de resistencia para los antibióticos probados (CMI en mg/l)				
ANTIBIÓTICO	FUENTE	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Claritromicina	HP	$\leq 2$		$\geq 4$
Amoxicilina	NCCLS	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Metronidazol	HP	$\leq 4$		$\geq 8$

Se utilizó la cepa control *Helicobacter pylori* NCTC 11637 en la realización de las pruebas de sensibilidad.

#### 3.4.1.4 MÉTODO DE DIFUSIÓN CON DISCO

Para los estudios de sensibilidad, se realizó la determinación de la CMI mediante dilución en agar. Sin embargo, con el fin de detectar sub-poblaciones resistentes a metronidazol, se utilizó un método de difusión con disco, de acuerdo con la siguiente metodología:

Un cultivo reciente del microorganismo se inoculaba en caldo brucella con 10% de suero fetal bovino y se incubaba durante 48 h en una estufa de CO<sub>2</sub>. Un ml de este caldo se inoculaba sobre una placa de agar Columbia con 5% de sangre de carnero, obtenida de forma comercial. Después de secarlas brevemente, se aplicaban los discos de antibióticos con unas pinzas estériles. Las placas se incubaban de 4 a 7 días en las condiciones habituales. La presencia de sub-poblaciones resistentes se investigaba utilizando discos de metronidazol con 10 µg. Las placas eran observadas cuidadosamente para detectar pequeñas colonias dentro de los halos de inhibición, que se subcultivaban y se comprobaba su resistencia por el método de dilución en agar o por el de difusión con disco. A las colonias resistentes se les denominó sub-poblaciones (sp) resistentes a metronidazol.

### 3.4.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se determinó la presencia de determinados marcadores fenotípicos (catalasa, oxidasa, ureasa y diferentes enzimas preformadas) de los aislamientos estudiados.

#### 3.4.2.1 ENZIMAS PARA DIAGNÓSTICO

Las pruebas de ureasa (urea de Christensen al 2% o del caldo indol/urea (BioMerieux)) y oxidasa (citocromo oxidasa, Organon Teknika) fueron realizadas según metodología estándar. La detección de catalasa se realizó en porta y en tubo con agua oxigenada al 3%.

#### 3.4.2.2 ENZIMAS PREFORMADAS

Se utilizó el sistema API ZYM (BioMerieux), previamente descrito por otros autores (Megraud 1985), para determinar la presencia o no de diversas enzimas preformadas. Las siguientes enzimas podían ser positivas en todos o en alguno de los aislamientos de *H. pylori*, y por lo tanto, son las que consideramos en este estudio: fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, esterasa lipasa (C8), leucina arilamidasa y naftol fosfohidrolasa. Se diluían cultivos del microorganismo, incubados durante 48 h, en 5 ml de suero fisiológico y se utilizaba para inocular una tira de API ZYM. Se incubaba durante 4 h a 37°C y se observaba la presencia de enzimas preformadas en el microorganismo, de acuerdo con un control positivo de color facilitado por la casa comercial.



### 3.4.3 CARACTERÍSTICAS DE VIRULENCIA

Se estudió la presencia de movilidad, citotoxicidad y gen *cagA*, parámetros que se han considerado marcadores de virulencia.

#### 3.4.3.1 MOVILIDAD

La movilidad del microorganismo se realizó de la siguiente forma: Se tomaron 0.5 ml de un cultivo de *H. pylori* (en caldo brucella con 10% de suero fetal bovino) y se inocularon en un medio de cultivo (agar Columbia con 7% de sangre de carnero o caballo) en tubo en visel. Después de una incubación de 48 h en una estufa con 5% de CO<sub>2</sub>, se observaba una gota del caldo del pico de flauta, en un microscopio óptico a 400 aumentos y se informaban los resultados como muy móvil (++), moderadamente móvil (+) o no móvil (-) de acuerdo con el número aproximado de bacterias móviles en 5 a 10 campos de observación.

#### 3.4.3.2 EFECTO VACUOLIZANTE

Para el estudio de la presencia o no de citotoxina, se determinó el efecto vacuolizante en células Vero. La metodología consistía en preparar un inóculo de *H. pylori* en caldo cerebro-corazón (BHI) con 10% de suero fetal bovino e incubarlo durante 48 h. El caldo era centrifugado, el sobrenadante obtenido se inoculaba sobre un cultivo celular de células Vero, y se observaba el efecto vacuolizante producido a las 48 h de incubación.

### 3.4.3.3 DETECCIÓN DEL GEN *cagA*

La detección del gen *cagA* se realizó mediante una técnica de RCP, siguiendo el protocolo que se encuentran en la tabla 12, con un volumen final de 50  $\mu$ l y en las condiciones de reacción recomendado por el fabricante de la Taq ADN polimerasa (Promega).

Tabla 12. Protocolo de RCP para detectar el gen *cagA* (Covacci 1994)

Secuencia de los iniciadores	<i>cagA</i> 1: 5'-ATA-AGC-TAA-ATT-AGA-CAA-CTT-GAG-CGA-3'	
	<i>cagA</i> 2: 5'-TTA-GAA-TAA-TCA-ACA-AAC-ATC-ACG-CCA-T-3'	
Condiciones de la reacción	Reactivo	Concentración
	<i>cagA</i> 1	0.6 $\mu$ M
	<i>cagA</i> 2	0.6 $\mu$ M
	dNTPs	0.2 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM
Ciclos de amplificación	desnaturalización inicial	94°C 2 min
	nº ciclos desnaturalización hibridación extensión	38 94°C 1 min 60°C 1 min 72°C 1 min
	extensión final	72°C 5 min
Tamaño del producto amplificado		297 pb

### 3.5 MÉTODOS DE TIPADO FENOTÍPICO

En las tablas 7, 8 y 9 se encuentran los pacientes estudiados por los métodos fenotípicos. Los microorganismos se agruparon según la sensibilidad o resistencia a los antibióticos probados (antibiotipo) y según la presencia o no de enzimas preformadas (biotipo).

Se definieron los siguientes antibiotipos, de acuerdo con la sensibilidad a metronidazol y/o claritromicina: antibiotipo I: MET<sup>S</sup> CLA<sup>S</sup>

antibiotipo II: MET<sup>R</sup> CLA<sup>S</sup>

antibiotipo III: MET<sup>R</sup> CLA<sup>R</sup>

Se definieron los siguientes biotipos, de acuerdo con la presencia a no de las enzimas preformadas.

Enzimas preformadas	BIOTIPOS		
	BIOTIPO I:BI	BIOTIPO II:BI	BIOTIPO III:BI
Fosfatasa alcalina	+	+	+
Fosfatasa ácida	+	+	+
Esterasa lipasa	+	-	-
Leucina arilamidasa	+	+	-
Naftol fosfohidrolasa	+	+	+

### 3.6 MÉTODOS DE TIPADO GENOTÍPICO

Los pacientes incluidos en este estudio se encuentran recopilados en las tablas 14, 15 y 16, que corresponden a los grupos explicados anteriormente. Se estudiaron un total de 59 aislamientos, 18 del Grupo 1, 17 del Grupo 2 (6 de ellos repetidos en el Grupo 1 ó 2) y 30 del Grupo 3.

#### 3.6.1 ESTUDIO DE PLÁSMIDOS

Para la detección de ADN plasmídico, se utilizaron 2 protocolos durante el estudio: el método de extracción descrito por Kado y Liu (1981) y el método de obtención de ADN cromosómico completo, observando la presencia de plásmidos mediante electroforesis del ADN sin digerir.

El método de Kado y Liu consiste, resumidamente en:

- 1.- A partir de un cultivo de *H. pylori*, incubado durante 48 h, se realizó una suspensión densa en 1 ml de tampón 50 mM Tris/1 mM EDTA a pH 8.
- 2.- Se centrifugó a 6.500 rpm durante 5 min, se resuspendió la muestra en 20 $\mu$ l del mismo tampón y se añadió 100 $\mu$ l de una solución 0.05 M Tris/3% SDS a pH 12.52 a 12.56.
- 3.- Se incubó entre 20 y 45 min a 55°C y se añadió 100  $\mu$ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min y la capa superior, que es la fase acuosa, se analizó en un gel de agarosa.

Los plásmidos se separaron en geles de 0.7% de agarosa, mediante una electroforesis durante 1.5 h a 150 V. Los geles era teñidos con 1  $\mu$ g/ml de Bromuro de

Etidio durante 30 minutos y los plásmidos se visualizaban en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaban con una Cámara Polaroid MP-4.

### 3.6.2 ESTUDIO DEL ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (ER)

Se realizó la digestión de concentraciones conocidas de ADN durante 4 h a 37°C con *HindIII* y *HaeIII*. El volumen de muestra adecuado para obtener 4 ó 5 µg de ADN se completó hasta 17 µl con agua destilada estéril, se añadió 1 µl del enzima y 2 µl del tampón de reacción recomendado para cada enzima, se mezcló e incubó 4 h a 37°C.

La reacción se terminó, añadiendo 7 µl de colorante de carga, y los fragmentos se separaron por electroforesis (25 V durante 16 h) en geles de agarosa al 0.7%, que contenían una concentración de 1 µg/ml de Bromuro de Etidio. En cada gel se incluyó un patrón de peso molecular conocido. El ADN se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografió con una Cámara Polaroid MP4. Para poder comparar fácilmente patrones del mismo paciente, eran digeridos simultáneamente y colocados próximos en el gel.

### 3.6.3 RCP CON INICIADORES ARBITRARIOS (RCP-IA)

El protocolo de extracción de ADN cromosómico utilizado fue el que se ha descrito previamente. La concentración de ADN se ajustó a 20 ng/ml y se realizó el protocolo de amplificación, de acuerdo con las condiciones descritas en la tabla 13. Los fragmentos amplificados se determinaron en geles de agarosa al 1.5% siguiendo la metodología habitual.

Tabla 13. Protocolo de amplificación de RCP-IA como método de tipado (Akopyanz 1992 b).

Secuencia de los iniciadores	IA-1: 5'-AAC-GCG-CAA-C-3'	
Condiciones de la reacción	Reactivo	Concentración
	IA-1	0.2 mM
	dNTPs	0.4 $\mu$ M
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	Taq polimerasa	1 U
	Volumen final	25 $\mu$ l
Ciclos de amplificación	nº ciclos	4
	desnaturalización	94°C 5 min
	hibridación	34°C 5 min
	extensión	72°C 5 min
	nº ciclos	30
	desnaturalización	94°C 50 seg
	hibridación	36°C 50 seg
	extensión	72°C 70 seg
	extensión final	72°C 5 min

#### 3.6.4 FRAGMENTO AMPLIFICADO DIGERIDO CON ER (ER-*ureB*)

Se estudiaron muestras de ADN extraído a partir de los aislamientos de *H. pylori*. Se realizó la amplificación del fragmento de 933 pb del gen de la *ureB*, que posteriormente fue digerido con el enzima de restricción *HaeIII*, en las condiciones recomendadas por el fabricante. Se produjo la digestión del ADN durante 4 h a 37°C y se finalizó la reacción con 7 µl del tampón de carga. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa, incluyendo el fragmento amplificado sin digerir, además de los controles habituales. El patrón de bandas, obtenido en los diferentes aislamientos, se utilizó para compararlos intentando definir la cepas como similares o diferentes. Cuando el enzima no digería el ADN amplificado, se observaba la banda del mismo tamaño que el fragmento original.

A esta técnica la llamamos ER-*ureB* por determinarse los fragmentos de restricción del producto amplificado del gen *ureB*.

Tabla 14. Aislamientos clínicos de *H. pylori* estudiados por métodos genotípicos de tipado, y técnicas o procedimientos realizados a cada uno de ellos. Grupo 1: Cepas obtenidas a partir del mismo paciente en diferentes fases del tratamiento (x = prueba realizada, - = no realizada).

nº	Paciente	Tratto	PL	ER	RCP-1A	ER-ureB
70	ISS	A	x	x	x	x
163	ISS	B6	x	x	-	-
190	ISS	B12	x	x	x	x
286	ISS	B18	x	x	-	x
72	EMG	B1	x	x	-	x
222	EMG	B12	x	x	x	x
468	EMG	B18	x	-	x	x
116	FP	B6	x	x	-	-
188	FP	B12	x	x	x	x
170	EQC	A	x	x	x	x
193	EQC	B1	x	x	x	x
179	ASR	A	x	x	x	x
283	ASR	B6	x	x	-	-
314	ASR	B12	x	-	x	x
301	JRM	B1	x	-	x	x
343	JRM	B12	x	-	x	x
255	JFG	A	x	-	x	-
282	JFG	B1	x	-	x	-
348	JFG	B6	-	-	-	-



Tabla 15. Aislamientos clínicos de *H. pylori* estudiados por métodos genotípicos de tipado, y técnicas o procedimientos realizados a cada uno de ellos. Grupo 2: Cepas de la misma muestra con diferencias en la morfología o en la sensibilidad y aislamientos de 2 hermanos (LP y FP) (x = prueba realizada, - = no realizada).

nº	Paciente	tratto	PL	ER	RCP-IA	ER-ureB
16	GS	A	x	-	-	x
16sp	GS	A	x	-	-	x
72	EMG	B1	x	-	-	-
72sp	EMG	B1	x	-	-	-
170	EQC	A	x	x	x	-
170sp	EQC	A	x	x	x	-
193	EQC	B1	x	x	x	-
193sp	EQC	B1	x	x	x	-
130	RTS	A	x	x	-	x
130sp	RTS	A	x	x	-	x
121 P	VRM	A	-	-	x	x
121 G	VRM	A	-	-	x	x
149 P	LP	A	x	-	-	-
149 G	LP	A	x	-	x	x
116	FP	B6	x	x	-	-
188	FP	B12	x	x	x	x
149 G	LP	A	x	-	x	x

Tabla 16. Aislamientos clínicos de *H. pylori* estudiados por métodos genotípicos de tipado, y técnicas o procedimientos realizados a cada uno de ellos. Grupo 3: Cepas de pacientes no relacionados (x = prueba realizada, - = no realizada).

nº	PL	ER	RCP-IA
39	x	x	-
73	x	-	-
83	x	x	x
101	x	-	-
106	x	-	x
121	x	x	-
122	x	-	-
125	x	-	-
156	x	-	-
165	x	-	-
166	x	x	x
174	x	x	-
178	-	x	-
197	x	x	-
233	x	x	x
242	x	x	-
248	x	-	x
253	x	x	x
259	x	-	x
274	x	x	x
293	x	x	x
305	x	x	-
325	-	-	x
387	-	-	x
392	-	-	x
419	-	-	x
441	-	-	x
444	-	-	x
463	-	-	x
504	-	-	x

### 3.7 ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS DE TIPADO

En el estudio de los métodos de tipado, se consideraron los siguientes criterios para determinar la posible utilidad de cada uno y para poder compararlos entre ellos:

**Tipabilidad:** El porcentaje de cepas que puede clasificarse con el método de tipado que estamos estudiando.

**Reproducibilidad:** Se puede definir de dos formas:

1) El porcentaje de cepas que, al repetir el experimento, produce el mismo resultado. En nuestro caso no utilizaremos esta definición.

2) El porcentaje de veces que los aislamientos del mismo paciente producen resultados concordantes con el considerado estándar. Como no existe ningún método estándar, hemos considerado que los aislamientos de un mismo paciente son iguales, cuando lo son, al menos con dos métodos, preferiblemente moleculares.

**Poder discriminatorio:** Se define como la probabilidad de que dos aislamientos no relacionados se incluyan en distinto tipo, utilizando un determinado método de tipado. Se calcula como un valor numérico, definido por el índice de discriminación (ID) a partir del estudio de un número adecuado de aislamientos no relacionados (Hunter 1988).

El ID viene definido por la siguiente ecuación. El método es más discriminatorio cuando el valor ID es más próximo a 1.

$$ID = 1 - \frac{1}{N \cdot (N-1)} \cdot \sum_1^s n_j \cdot (n_j - 1)$$

$N$  = nº total de cepas

$s$  = nº total de tipos

$n_j$  = nº de cepas en el tipo  $j$

Para el cálculo del ID, hemos considerado todos los aislamientos no relacionados y el primer aislamiento obtenido a partir de un paciente (en el caso de disponer de más de 1 aislamiento por paciente).

### 3.8 VALORACIÓN COSTE/BENEFICIO DE LOS MÉTODOS DE TIPADO

Se realizó una valoración coste/beneficio de los siguientes métodos de tipado:

- 1) Biotipo con API ZYM,
- 2) Estudio de plásmidos,
- 3) Estudio de ADN total con ER,
- 4) Análisis de ADN total por RCP-IA y
- 5) Estudio de ADN total por ER-*ureB*

En primer lugar, se realizó un presupuesto detallado del coste (en pts) del material y de los reactivos necesarios para el estudio de una muestra por cada método. Además, se realizó un estudio aproximado del tiempo de trabajo, por parte del personal técnico o facultativo en la realización de cada método, y del tiempo total necesario para obtener el resultado final.

#### 3.8.1 PRESUPUESTO DE LOS MÉTODOS DE TIPADO

El presupuesto, para la realización de una muestra por cada método de tipado, se obtuvo aplicando la siguiente fórmula

$$\text{precio/muestra} = \text{Cantidad/muestra} \times \frac{\text{Precio /envase}}{\text{Cantidad /envase}}$$

Los precios de los productos pueden variar de unas casas comerciales a otras. En este estudio se han considerado los que se encuentran en la tabla 17. Este presupuesto podría verse modificado, probablemente no de forma sustancial, si se utilizaran presupuestos de otras casas.

Tabla 17. LISTA DE PRECIOS (1995)

Producto	Proveedor	Precio (pts)	Cantidad/envase
TRIZMA BASE	SIGMA	16.470	1 Kg
AC. BÓRICO	SIGMA	8.070	1 Kg
EDTA	SIGMA	11.300	500 g
SACAROSA	SIGMA	5.590	1 Kg
AZUL BROMOFENOL	SIGMA	5.290	10 g
CTAB	SIGMA	16.310	500 g
NaCl	SIGMA	6.600	1 Kg
SDS	SIGMA	12.280	250 g
PROTEINASA K	SIGMA	10.280	100 mg
FENOL/CLOROFORMO/ALCOHOL ISOAMÍLICO	SIGMA	20.390	400 ml
CLOROFORMO/ALCOHOL ISOAMÍLICO	SIGMA	2.889	250 ml
ISOPROPANOL	SIGMA	3.470	480 ml
ETANOL	SIGMA	4.090	1 l
TAQ POLIMERASA	PROMEGA	185.164	2.500 u
INICIADORES	SIGMA	550 pts/pb	10.000 $\mu$ l
dNTPs	SIGMA	12.480	0.5 ml (10 mM)
AGAROSA	SIGMA	65.980	250 g
BROMURO DE ETIDIO	SIGMA	33.180	50 ml (10 mg/ml)
MARCADOR PESO MOLECULAR	SIGMA	14.250	20 $\mu$ g
PELÍCULA FOTOGRÁFICA	SIGMA	4.740	20 u
TUBOS 0.5 ml	SIGMA	11.040	1.000 u
TUBOS 1.5 ml	SIGMA	7.440	1.000 u
PUNTAS CON FILTRO	PROMEGA	22.000	1.000 u
ACEITE MINERAL	SIGMA	3.340	25 ml
<i>Hae</i> III	SIGMA	9.910	2.500 u
<i>Hind</i> III	SIGMA	7.440	5.000 u
API ZYM	BIOMERIEUX	23.000	25 tiras

1.- Se calculó, en primer lugar, el presupuesto de cada una de las soluciones y reactivos utilizados en los diversos métodos de biología molecular.

Tampón TBE. Calculado precio/litro				
Producto	Cantidad/L	Cantidad/envase	PVP/envase	PVP/L
TRIZMA	10,8 g	1.000 g	16.470	177,9
Ac Bórico	5,5 g	1.000 g	8.070	44,3
EDTA	0,46 g	500 g	11.300	10,4
TOTAL (pts/litro)				232,6

Tampón de carga. Calculado precio/100 ml				
Producto	Cantidad/ 100ml	Cantidad/ envase	PVP/envase	PVP/100 ml
Sacarosa	40 g	1.000 g	5.500	223,6
Azul bromofenol	0,15 g	10 g	5.290	79,3
EDTA	37,2 g	500 g	11.300	840,72
Total (pts/100 ml)				1.143,6

CTAB: Calculado precio/100 ml				
Producto	Cantidad/ 100 ml	Cantidad/ envase	PVP/envase	PVP/100 ml
CTAB	10 g	500 g	16.310	326,2
NaCl	4,1 g	1.000 g	6.600	27,1
Total (pts/100 ml)				<b>353,3</b>

Tampón TE: calculado precio/litro				
Producto	Cantidad/L	Cantidad/envase	PVP/envase	PVP/L
TRIZMA	1,21 g	1.000 g	16.470	19,9
EDTA	0,37 g	500 g	11.300	8,4
Total (pts/litro)				<b>28,3</b>

NaCl 5 M: calculado precio/litro				
Producto	Cantidad/L	Cantidad/envase	PVP/envase	PVP/L
NaCl	292,2 g	1.000 g	6.600	<b>1.928</b>

SDS 10%: calculado precio/100 ml				
Producto	Cantidad/100ml	Cantidad/envase	PVP/envase	PVP/100ml
SDS	10 g	250 g	12.280	<b>491,2</b>



2.- En segundo lugar, se calcularon los presupuestos de los métodos generales utilizados en todos los protocolos de biología molecular.

Extracción de ADN (para 1 muestra)				
Producto	Cantidad/ muestra	Cantidad/ envase	PVP/ envase	PVP/ muestra
Tampón TE	0,567 ml	1.000 ml	28,3	0,02
CTAB	0,08 ml	100 ml	353,3	0,28
NaCl 5M	0,1 ml	1.000 ml	1.928,5	0,19
Proteinasa K	0,07 mg	100 mg	10.280	7,19
SDS	0,03 ml	100 ml	491,2	0,14
Phenol/cloroformo/ alcohol isoamílico	0,75 ml	400 ml	20.390	38,2
Cloroformo/alcohol isoamílico	0,75 ml	250 ml	2.889	8,66
Isopropanol	0,4 ml	480 ml	3.470	2,89
Etanol	1 ml	1.000 ml	4.090	4,09
Total (pts/muestra)				<b>61,7</b>

Digestión con enzimas de restricción				
	Cantidad/ muestra	Cantidad/ envase	PVP/envase	PVP/muestra
<i>Hae</i> III	40 u	2.500 u	9.910	<b>158,56</b>
<i>Hind</i> III	40 u	5.000 u	7.440	<b>59,52</b>

Amplificación estándar (un 20% más por los 2 controles/8 muestras)				
Producto	Cantidad/ muestra	Cantidad/ envase	PVP/ envase	PVP/ muestra
Polimerasa	1,25 U	2.500 u	185.164	92,6
Iniciadores	2 $\mu$ l	10.000 $\mu$ l	11.000	2,2
dNTPs	0,5 $\mu$ M	10 mM	12.480	0,6
Total (pts/muestra) = 95,4 pts + 19,1 (20%) =				<b>114,48</b>

Amplificación RCP-IA (un 10% más por un control cada 9 muestras)				
Producto	Cantidad/ muestra	Cantidad/envase	PVP/ envase	PVP/ muestra
Polimerasa	1 U	2.500 u	185.164	74,1
Iniciadores	1 $\mu$ l	10.000 $\mu$ l	11.000	1,1
dNTPs	0,5 $\mu$ M	10 mM	12.480	0,6
Total (pts/muestra) = 75,8 pts + 7,6 (10%) =				<b>83,4</b>

Electroforesis (para 1 gel de 10 pocillos)				
Producto	Cantidad/ muestra	Cantidad/ envase	PVP/ envase	PVP/ muestra
Agarosa	1 g	250 g	65.980	263,9
BrEt	35 $\mu$ g	500 g	33.180	2,3
tampón de carga	50 $\mu$ l	100 ml	1.143,6	0,57
Marcador PM	0,25 $\mu$ g	20 $\mu$ g	14.250	178,1
Tampón TBE	300 ml	1.000 ml	232,6	69,8
Película fotos	1 U	20 u	4.740	237
Total (pts/1 gel)				<b>751,7</b>

Gel RCP normal = 7 muestras/gel --- 107,4 pts/muestra

Gel RCP-IA = 8 muestras/gel --- 93,9 pts/muestra

Gel plásmidos = 9 muestras/gel --- 83,5 pts/muestra

Otros gastos de RCP				
Producto	Cantidad/ muestra	Cantidad/ envase	PVP/ envase	PVP/ muestra
tubos 0,6 ml RCP	1 U	1.000 u	11.040	11,04
tubos 1,5 ml extracción	4 U	1.000 u	7.440	29,76
puntas filtro RCP	4 U	1.000 u	22.000	88
Total (pts/muestra)				<b>128,8</b>

**3.8.2 TIEMPO INVERTIDO POR EL PERSONAL TÉCNICO O FACULTATIVO**

Se valoró el tiempo de trabajo dedicado por el personal técnico para la realización de cada método. Se ha realizado un cálculo aproximado del tiempo necesario para la realización de los protocolos, sin considerar los tiempos de incubación largos ni los tiempos de espera.

**3.8.3 TIEMPO NECESARIO PARA LA OBTENCIÓN DE RESULTADOS**

Se ha realizado un cálculo estimativo del tiempo que consideramos necesario, teniendo en cuenta los tiempos de incubación y de espera, además del tiempo de ejecución de la técnica.

Para la valoración final del estudio económico, se puntuó cada método de 1 a 5 en cuanto a precio, tiempo de trabajo del personal técnico y tiempo en obtener resultados, asignando la mayor puntuación al método más barato, más rápido en cuanto a tiempo consumido por el personal para su realización o tiempo total para obtener el resultado final.

## **4. RESULTADOS**

## 4.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori*

### 4.1.1 COMPARACIÓN DE INICIADORES

Los resultados se encuentran en la tabla 18.

La concentración de ADN detectada por la técnica de la RCP en cada aislamiento era diferente, aunque en su mayoría entre 200 y 12 pg. Si modificáramos en cada caso concreto las condiciones de la reacción de la RCP, podría ganarse sensibilidad en algunas cepas, perdiéndose probablemente en otras. La variabilidad en el nivel de detección puede estar influenciado por la calidad del ADN que se ha obtenido en cada extracción o por el número de copias de los genes presentes en cada tipo de cepa. Por lo tanto, los estudios para determinar la sensibilidad de la RCP en este tipo de bacterias, no deben realizarse únicamente sobre una cepa, pues el resultado puede ser variable.

Se observó que en los 3 aislamientos, los iniciadores dirigidos frente al gen *ureA* detectaron la concentración más baja de ADN de *H. pylori*: 100, 25 o 12 pg en cada aislamiento. La RCP frente al gen *ureB* detectó menor concentración de ADN que frente al gen *ARNr* en dos de las muestras; sin embargo, en la tercera se observó lo contrario.

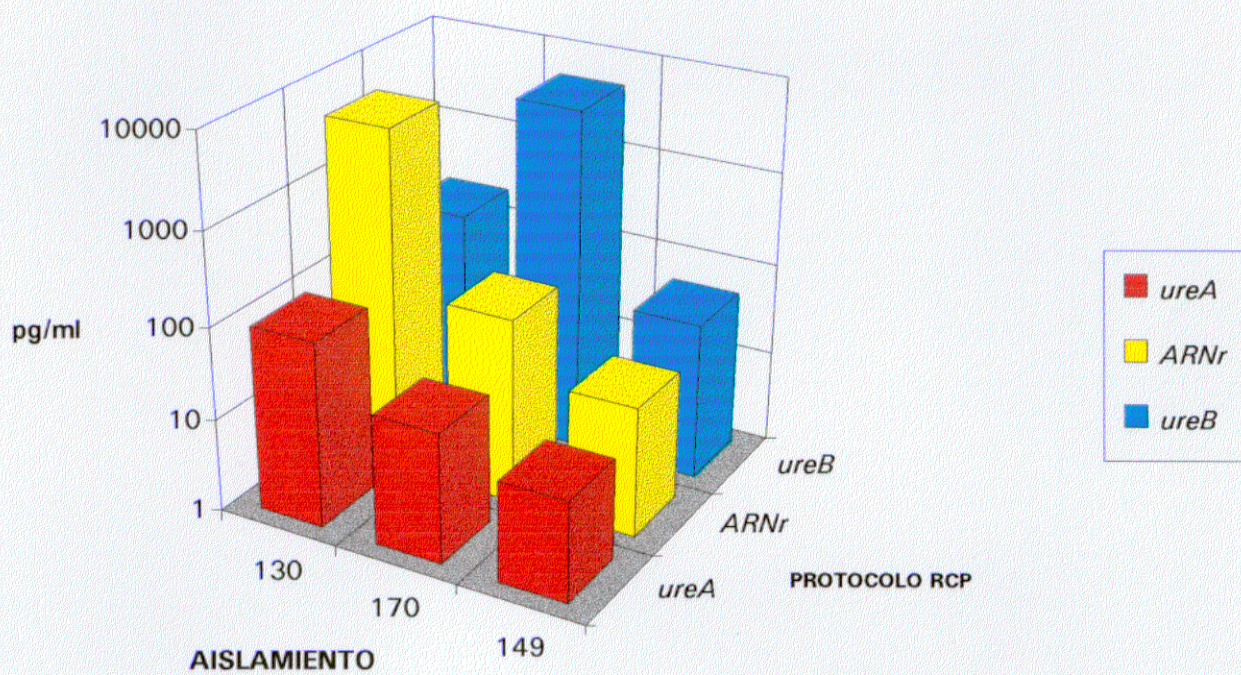
Por este motivo, se eligieron los iniciadores dirigidos frente al gen *ureA* para los estudios posteriores.

Tabla 18. Concentración de ADN de cada cepa, con la que se obtuvo resultado positivo para la prueba de RCP.

Nº cepa	Concentración de ADN	<i>ARNr</i>	<i>ureA</i>	<i>ureB</i>
130	Control +: 5 ng	+	+	+
	200 pg	-	+	+
	100 pg	-	+	-
	50 pg	-	-	-
	25 pg	-	-	-
	12 pg	-	-	-
170	Control +: 5 ng	+	+	+
	200 pg	+	+	-
	100 pg	+	+	-
	50 pg	-	+	-
	25 pg	-	+	-
	12 pg	-	-	-
149	Control +: 5 ng	+	+	+
	200 pg	+	+	+
	100 pg	+	+	+
	50 pg	+	+	+
	25 pg	+	+	-
	12 pg	-	+	-



Figura 8. Nivel de ADN detectado por cada tipo de RCP, en los 3 aislamientos de *H. pylori* probados.





#### 4.1.2 RCP A PARTIR DE COLONIAS

Los resultados obtenidos para cada aislamiento se encuentran en la tabla 19. Todos los aislamientos dieron positiva la prueba de RCP, cuando se utilizaban los iniciadores específicos de los genes *ureA*, *ureB* y *ARNr* de *H. pylori*. En este último caso sólo pudieron probarse 23 aislamientos.

Según estos resultados, cualquiera de los protocolos de RCP estudiados podrían ser utilizados para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*.

#### 4.1.3 RCP A PARTIR DE BIOPSIAS

De las 57 muestras de biopsia gástrica estudiadas se observó que en 34 muestras (59.6%) el resultado fue positivo y en las otras 23 muestras (40.3%), negativo. Los resultados se encuentran en la tabla 20.

Tabla 19. Aislamientos clínicos de *H. pylori*, a los que se realizó la prueba de RCP con los 3 tipos de iniciadores utilizados.

nº	iniciales	RCP <i>ureA</i>	RCP <i>ureB</i>	RCP <i>ARNr</i>
16	CGS	+	+	+
116	FPC	+	+	+
121	VRM	+	+	+
122	JCLR	+	+	+
130	RTS	+	+	+
144	SC	+	+	+
149	LP	+	+	+
166	TGH	+	+	—
219	SFL	+	+	—
348	JFG	+	+	—
426	FMR	+	+	+
440	SA	+	+	+
463	MAT	+	+	+
534	MMA	+	+	+
537	NFG	+	+	+
558	LCP	+	+	ND
560	JFRM	+	+	+
568	FBG	+	+	+
585	EGM	+	+	+
590	CGS	+	+	+
604	CUA	+	+	+
605	ASF	+	+	+
613	ABCR	+	+	+
614	JAHM	+	+	+
620	SGB	+	+	ND

Tabla 20. Pacientes incluidos en el estudio de técnicas de diagnóstico de la infección por *H. pylori*.

Nº	NOMBRE	FECHA	BIOP	CULT	HIST	RCP <i>ureA</i>	RCP <i>βglo</i>
451	CMQ	18-2-94	A	C	+++	+	ND
461	EGL	11-3-94	B1	C	+++	+	ND
463	MAT	11-3-94	A	+	+	+	ND
468	EMG	11-3-94	B12	+	+++	+	ND
469	JAH	18-3-94	A	+	+++	+	ND
495	JHZ	25-4-94	A	C	++	-	+
496	RGM	25-4-94	A	C	ND	+	ND
504	RHF	6-5-94	A	+	+++	+	+
505	VSG	6-5-94	A	C	++	-	+
512	CMC	27-5-94	A	-	++	-	+
546	AR	? -9-94	A	-	ND	-	+
547	BCJ	? -9-94	A	+	+/-	+	+
549	AFG	23-9-94	A	-	ND	-	+
550	LCP	23-9-94	B1	-	ND	+	ND
551	JBB	23-9-94	A	+	+/-	+	+
553	AGS	10-10-94	A	-	ND	+	ND
554	PPI	10-10-94	A	-	-	-	+
555	GPC	10-10-94	A	-	-	-	+
556	JRB	10-10-94	A	-	ND	-	+
557	MCM	2-10-94	B1	C	-	+	ND
558	ASF	2-10-94	A	+	+++	+	ND
559	RVF	2-10-94	B1	C	ND	-	+
560	JERM	2-10-94	B12	+	+	+	ND
561	HAGP	28-10-94	?	-	-	-	+
562	MCB	28-10-94	?	-	+	+	ND
563	MMB	28-10-94	?	-	ND	-	+
564	AHB	28-10-94	?	-	-	-	+
565	PPT	28-10-94	?	-	++	-	+
566	LPL	28-10-94	A	-	-	-	+

Tabla 20 (cont)

Nº	NOMBRE	FECHA	BIOP	CULT	HIST	RCP <i>ureA</i>	RCP <i>βglo</i>
567	IRC	28-10-94		-	ND	-	+
568	FBG	4-11-94		+	+++	+	ND
569	NLA	4-11-94		-	-	+	ND
570	DRS	4-11-94		+	+++	+	+
571	FHS	18-11-94	B12	-	+/-	+	ND
572	LMM	18-11-94	A	-	++	+	+
573	IPR	18-11-94	A	-	-	-	+
574	CAU	18-11-94	A	+	++	+	ND
575	MJBL	18-11-94	A	-	+/-	+	+
576	DGD	18-11-94	A	+	+/-	+	+
577	AFC	25-11-94	A	-	-	-	+
578	SGB	25-11-94	A	+	++	+	+
579	AGB	25-11-94	A	-	ND	+	ND
580	RJF	25-11-94	A	C	-	+	ND
581	AMM	25-11-94	A	C	-	+	+
582	BCJ	25-11-94	B1	C	+++	+	ND
583	IMH	25-11-94	B12	C	++	-	+
584	JLMF	25-11-94	A	C	ND	-	+
585	EGM	2-12-94	A	+	++	+	+
586	EFP	2-12-94	A	-	ND	-	+
587	JCM	2-12-94	A	-	ND	-	+
588	DFM	16-12-94	A	+	ND	+	+
589	JMA	16-12-94	B1	-	-	-	+
590	CGS	16-12-94	B12	+	+++	+	+
591	VCM	16-12-94	A	+	++	+	ND
592	MCB	16-12-94	B1	+	++	-	+
593	JBB	16-12-94	B1	-	-	+	ND
594	BAA	16-12-94	A	-	+++	+	ND

Figura 9. Fragmentos amplificados obtenidos con cada tipo de iniciadores.

Línea 3, 6, 9 y 11, marcadores de peso molecular.

Línea 1 y 2, control + y control - con el gen *ureA*.

Línea 4 y 5, control - y control + con el *ureB*.

Línea 7 y 8, control - y control + con el gen *ARNr*.

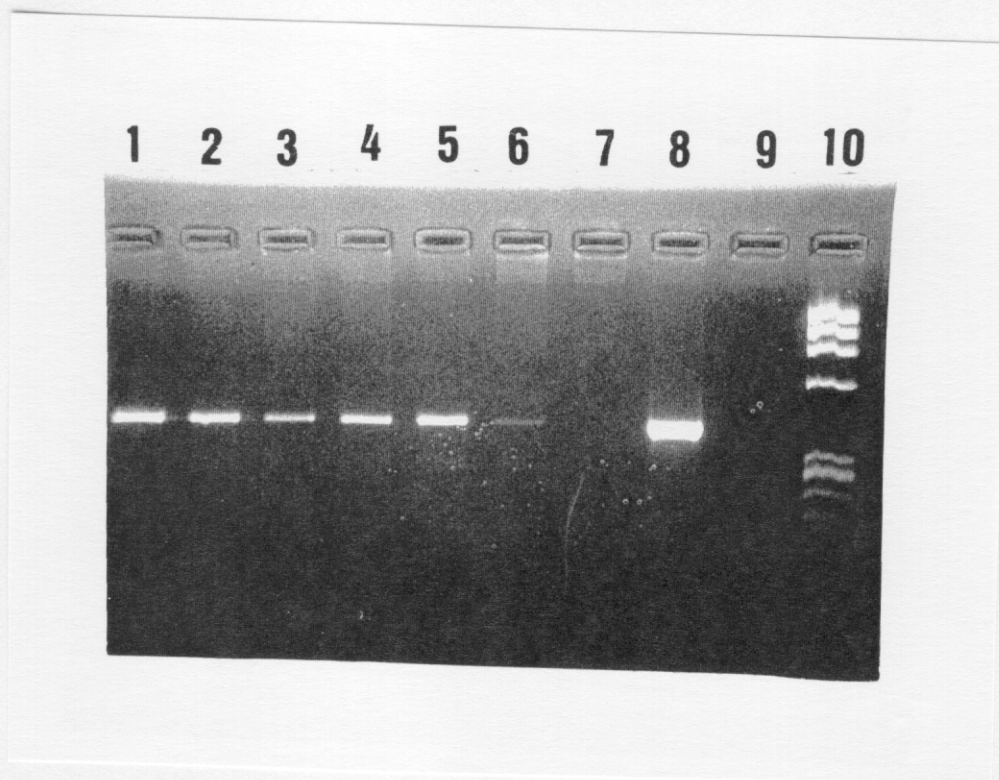
Línea 10, control + con iniciadores de  $\beta$ -globina.



Figura 10. Gel de electroforesis donde se han estudiado 7 muestras de biopsia gástrica mediante RCP, con los iniciadores frente al gen *ureA*.

Línea 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 muestras de biopsia números 451, 461, 463, 468, 469, 504 y 505 respectivamente.

Línea 8, 9 y 10: control +, control - y marcador de peso molecular.



#### 4.1.4 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS

El número y porcentaje de biopsias que produjeron resultado positivo, negativo y contaminado o dudoso por cada método estudiado, se encuentran en la tabla siguiente:

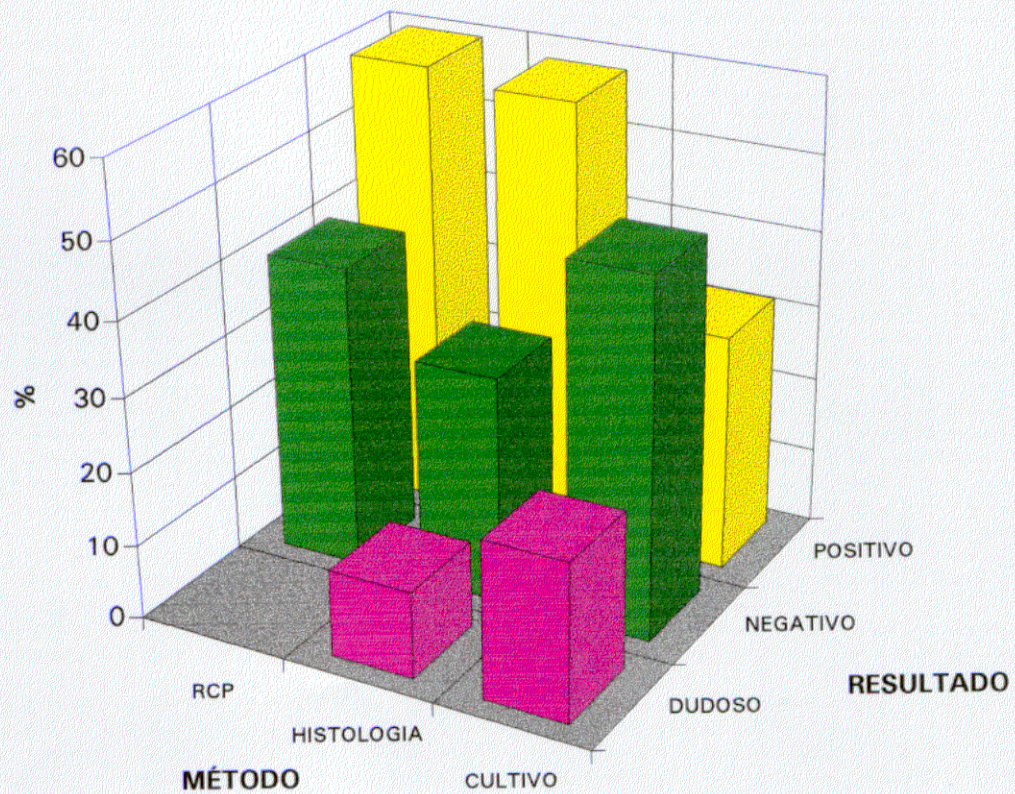
Diagnóstico		Positivo	Contaminado/ dudoso	Negativo	Total
Cultivo	nº	18	12	27	57
	%	31.5%	21%	47.4%	
Histología	nº	25	5	13	43
	%	58.1%	11.6%	30.2%	
RCP	nº	34	-	23	57
	%	59.6%	-	40.4%	

De las 57 muestra estudiadas por cultivo, 31.5 % (18 muestras) dieron resultados positivos, 21 % (12 muestras) estuvieron contaminadas y 47.4 % (27 muestras) resultaron negativas. La alta tasa de cultivos contaminados, estuvo producida por una contaminación de la solución de transporte con *P. aeruginosa*, durante una parte del estudio, y por no disponer de medio de cultivo selectivo, durante otra.

De las 43 muestras estudiadas por histología, el 58.1 % (25 muestras) dieron resultado positivo, 11.6 % (5 muestras) tuvieron resultado dudoso y 30.2 % (13 muestras) mostraron resultado negativo.



Figura 11. Porcentaje de biopsias que mostraron un resultado positivo, dudoso (o contaminado) y negativo por cada uno de los métodos de diagnóstico utilizados.





Comparando los resultados de RCP con los de los métodos de diagnóstico considerados de referencia (REF: histología y/o cultivo), se observa que:

Resultados concordantes:

RCP + REF + : 25/57 muestras (43.8%).

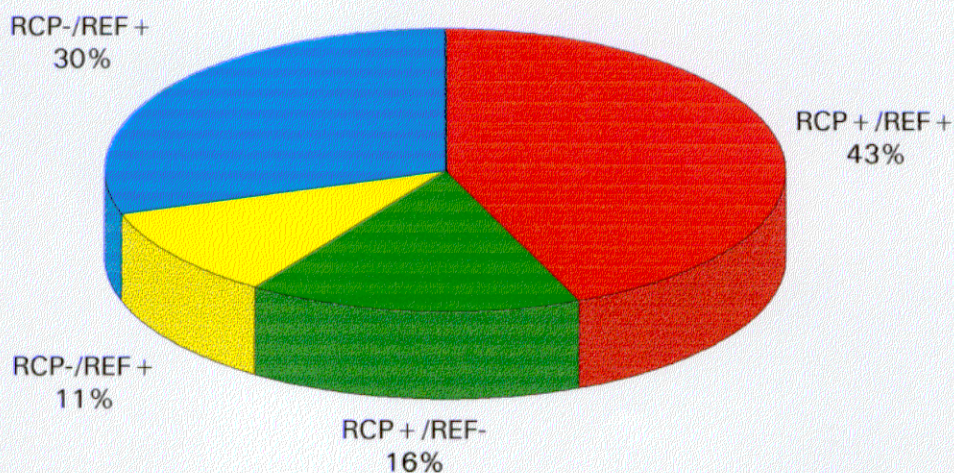
RCP - REF - : 17/57 muestras (29.8%).

Resultados no concordantes:

RCP + REF - : 9/57 muestras (15.8%).

RCP - REF + : 6/57 muestras (10.5%) (en 5 muestras el único método utilizado fue histología, y la sexta fue positiva por cultivo e histología y negativa por RCP).

Figura 12. Concordancia entre resultados de RCP y los métodos considerados de referencia (REF).





#### 4.2 CARACTERÍSTICAS DE *H. pylori*

Los resultados obtenidos en los estudios de las características de *H. pylori*, tanto de sensibilidad como bioquímicas o de virulencia, se encuentran agrupados en las tablas 21, 22 y 23.

Tabla 21. Aislamientos clínicos de *H. pylori* estudiados para detectar diferentes características. Grupo 1: Cepas del mismo paciente en diferentes momentos del tratamiento.

nº	Paciente	Tratto	Enzimas preformadas					Sensibilidad (CMI en mg/l)			mov	tox Vero	RCP <i>cagA</i>
			FAL	FAC	EL	LA	NF	MET	AMX	CLA			
70	ISS	A	+	+	+	+	+	2	0.008	0.016	-	+	ND
163	ISS	B6	+	+	+	+	+	2	0.125	0.008	ND	ND	ND
190	ISS	B12	+	+	-	+	+	2	0.125	0.008	+	ND	ND
286	ISS	B18	ND	ND	ND	ND	ND	64 R	0.125	ND	ND	ND	ND
72	EMG	B1	+	+	-	-	+	0.125	0.008	0.008	-	-	+
222	EMG	B12	+	+	-	+	+	1	0.008	0.008	++	ND	ND
468	EMG	B18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
116	FP	B6	+	+	-	+	+	32 R	0.5	0.064	ND	-	+
188	FP	B12	+	+	-	+	+	32 R	0.25	0.008	+	ND	ND
170	EQC	A	+	+	+	+	+	1	0.008	0.016	+	ND	-
193	EQC	B1	+	+	-	+	+	1	0.008	0.008	++	ND	+
179	ASR	A	+	+	+	+	+	4	0.032	0.008	++	ND	-
283	ASR	B6	+	+	-	-	+	32 R	0.032	ND	+	ND	ND
314	ASR	B12	ND	ND	ND	ND	ND	16 R	0.064	0.016	ND	ND	ND
301	JRM	B1	+	+	+	+	+	32 R	0.008	4 R	+	ND	+
343	JRM	B12	ND	ND	ND	ND	ND	32 R	0.008	4 R	ND	ND	+
255	JFG	A	+	+	+	+	+	0.5	0.25	ND	ND	ND	+
282	JFG	B1	+	+	-	+	+	ND	ND	ND	+	ND	+
348	JFG	B6	ND	ND	ND	ND	ND	128 R	0.25	0.064	ND	ND	+

Tabla 22. Aislamientos clínicos de *H. pylori* estudiados para determinar diferentes características. Grupo 2: Cepas de la misma muestra, con diferencias en la morfología o en la sensibilidad (sensible y sub-población resistente (sp) o morfología grande (G) y pequeña (P)), y aislamientos de 2 hermanos (FP y LP) (El patrón sombreado corresponde a aislamientos que están repetidos en el Grupo 1 ó 2).

nº	Paciente	Tratto	Enzimas preformadas					Sensibilidad (CMI en mg/l)			mov	tox Vero	RCP <i>cagA</i>
			FAL	FAC	EL	LA	NF	MET	AMX	CLA			
16	GS	A	+	+	+	+	+	2	0.008	0.016	ND	+	ND
16sp	GS	A	ND	ND	ND	ND	ND	4	ND	0.008	ND	ND	ND
72	EMG	B1	+	+	-	-	+	0.125	0.008	0.008	-	-	+
72sp	EMG	B1	ND	ND	ND	ND	ND	0.5	0.016	0.008	ND	ND	ND
170	EQC	A	+	+	+	+	+	1	0.008	0.016	-	ND	-
170sp	EQC	A	+	+	-	+	+	8 R	0.008	0.016	+	ND	ND
193	EQC	B1	+	+	-	+	+	1	0.008	0.008	++	ND	+
193sp	EQC	B1	ND	ND	ND	ND	ND	32 R	0.008	0.016	ND	ND	ND
130	RTS	A	+	+	-	+	+	2	0.064	0.016	++	ND	+
130sp	RTS	A	ND	ND	ND	ND	ND	128 R	0.008	0.008	ND	ND	ND
149 P	LP	A	+	+	+	+	+	4	0.125	0.008	-	+	+
149 G	LP	A	+	+	+	+	+	4	0.125	ND	++	+	ND
116	FP	B6	+	+	-	+	+	32 R	0.5	0.016	ND	-	+
188	FP	B12	+	+	-	+	+	32 R	0.25	0.008	+	ND	ND
149	LP	A	+	+	+	+	+	4	0.125	0.008	?	ND	+

Tabla 23. Aislamientos clínicos de *H. pylori* estudiados para determinar diferentes características. Grupo 3: Cepas obtenidas de pacientes no relacionados.

nº	Enzimas preformadas					Sensibilidad (CMI en mg/l)			mov	tox Vero	RCP <i>cagA</i>
	FAL	FAC	EL	LA	NF	MET	AMX	CLA			
15	+	+	-	+	+	1	0.008	0.008	++	ND	ND
39	+	+	+	+	+	1	0.016	1	+	-	-
73	+	+	-	+	+	2	0.064	0.032	+	-	ND
83	+	+	-	-	+	0.25	0.008	0.032	++	-	ND
101	+	+	+	+	+	1	0.008	ND	ND	-	ND
106	+	+	-	+	+	1	0.008	0.008	++	-	-
121	+	+	-	-	+	0.064	0.016	0.016	++	+	-
122	+	+	-	+	+	16 R	0.064	0.008	+	-	+
125	+	+	-	+	+	128 R	0.125	0.008	ND	+	ND
156	+	+	-	+	+	1	0.008	0.016	-	ND	+
165	ND	ND	ND	ND	ND	0.5	0.125	0.008	ND	ND	ND
166	+	+	-	-	+	0.125	0.064	0.008	+	-	-
174	+	+	-	+	+	0.25	0.008	0.008	+	ND	ND
178	+	+	-	-	+	0.008	0.008	0.008	++	ND	-
186	ND	ND	ND	ND	ND	32 R	0.25	0.008	ND	ND	ND
197	+	+	-	-	+	1	0.008	0.008	+	ND	-
233	+	+	-	+	+	0.5	0.032	0.008	+	ND	-
242	+	+	-	+	+	1	0.064	0.008	+	ND	-
248	+	+	-	-	+	2	0.008	ND	++	ND	-
253	+	+	-	+	+	1	0.008	0.032	++	ND	ND
259	ND	ND	ND	ND	ND	1	0.008	0.008	ND	ND	-
305	+	+	+	+	+	16 R	0.125	0.008	++	ND	ND

#### 4.2.1 CARACTERÍSTICAS DE SENSIBILIDAD

En las tablas 21, 22 y 23 se encuentran los datos de sensibilidad de los aislamientos de *H. pylori* estudiados, frente a amoxicilina, claritromicina, y metronidazol.

En la tabla 24 se encuentran los resultados globales, expresados en términos de CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, intervalo y porcentajes de resistencia (% R). Para este cálculo se han considerado los aislamientos de pacientes no relacionados, así como el primero obtenido, cuando existe más de uno por paciente.

Tabla 24. Resultados de CMI de los aislamientos estudiados, expresados en forma de la CMI para el 50 y el 90% de las cepas estudiadas, el intervalo entre los que se encuentran todos los aislamientos y el porcentaje de resistencia (%R) (Los datos de CMI se expresan como mg/l. n° es el número de aislamientos probados para cada antibiótico).

Antibiótico	n°	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	% R
Amoxicilina	29	0.008	0.125	0.008-0.5	0%
Metronidazol	29	1	32	0.008-128	20.7%
Claritromicina	26	0.008	0.064	0.008-4	3.8%

#### 4.2.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa fueron positivas en los aislamientos en el momento del cultivo primario, antes de su congelación y conservación durante periodos prolongados.

El porcentaje de cepas que producían cada tipo de enzimas preformadas se encuentran en la tabla 25. Se han considerado los aislamientos de pacientes no relacionados, así como el primero obtenido, cuando existe más de uno por paciente.

Tabla 25. Número (nº) y porcentaje (%) de cepas que presentaron cada una de las enzimas preformadas estudiadas (El número total de aislamientos fue 29).

ENZIMAS PREFORMADAS	POSITIVO		NEGATIVO	
	nº	%	nº	%
Fosfatasa alcalina	29	100 %		
Fosfatasa ácida	29	100 %		
Esterasa lipasa	11	37.9 %	18	62 %
Leucina arilamidasa	21	72.4 %	8	27.5 %
Naftol fosfohidrolasa	29	100 %		

### 4.2.3 CARACTERÍSTICAS DE VIRULENCIA

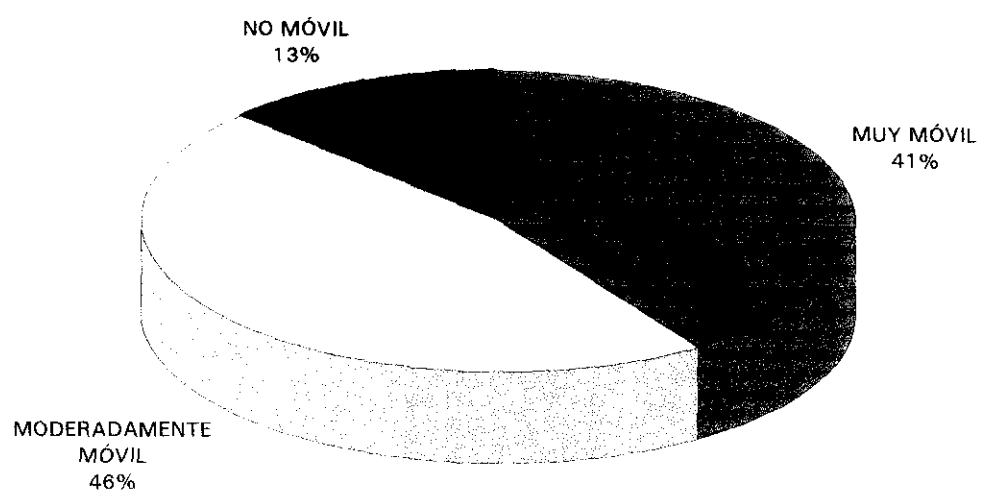
#### 4.2.3.1 MOVILIDAD

Se determinó en 32 aislamientos de *H. pylori* siguiendo la metodología anteriormente descrita. Se clasificaron como no móviles, moderadamente móviles o muy móviles, de acuerdo con un criterio lo más objetivo posible en la visión microscópica. Se incluyeron aislamientos del mismo paciente porque presentaron diferentes resultados.

Tabla 26. Número (nº) y porcentaje (%) de cepas que mostraron cada tipo de movilidad entre los 32 aislamientos estudiados.

Movilidad	nº	%
muy móviles	13	40.6 %
moderadamente móviles	15	46.8 %
no móviles	4	12.5 %

Figura 13. Porcentaje de aislamientos que fueron muy móviles, moderadamente móviles o no móviles.





#### 4.2.3.2 TOXICIDAD Y GEN *cagA*

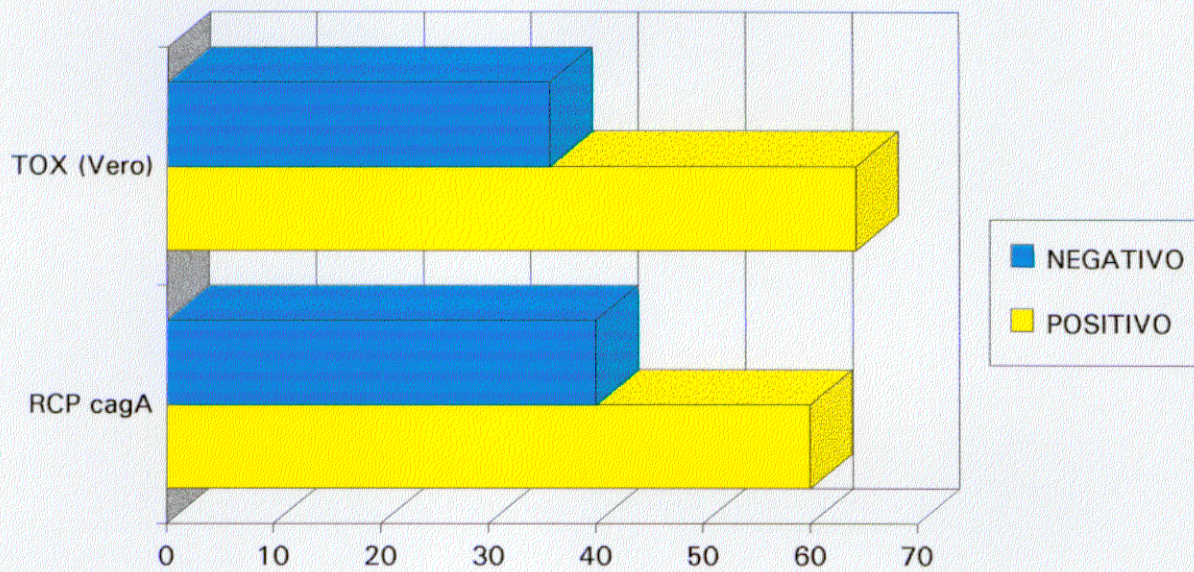
El efecto vacuolizante en células Vero se determinó en un total de 14 aislamientos de *H. pylori*, obtenidos a partir de 14 pacientes pediátricos. Se estudió la presencia del gen *cagA* mediante RCP en 20 aislamientos pertenecientes a 20 pacientes. Los resultados se encuentran en la tabla 27. Se consideró el primer aislamiento de cada paciente, cuando se obtenía más de uno.

Tabla 27. Número y porcentaje de cepas que obtuvieron resultados positivos o negativos, por el método fenotípico de detección de efecto vacuolizante en células Vero y el método genotípico de detección del gen *cagA*.

Método	nº total	Positivo		Negativo	
		nº	%	nº	%
Tox (Vero)	14	5	35.7%	9	64.3%
RCP <i>cagA</i>	20	8	40%	12	60%



Figura 14. Porcentaje de aislamientos que mostraron efecto vacuolizante y resultaron positivos para la RCP del gen *cagA*.





Se trató de determinar si existía concordancia entre los resultados de toxicidad determinados por el método fenotípico (detección de efecto vacuolizante en cultivos celulares de células Vero) y la detección del gen *cagA* mediante RCP.

Tabla 28. Se muestran los resultados obtenidos en 8 aislamientos en los que se utilizaron los dos métodos.

Nº de aislamiento de <i>H. pylori</i>	RESULTADO	
	Vero	RCP <i>cagA</i>
72	-	+
116	-	+
149 P	+	+
39	-	-
106	-	-
121	+	-
122	-	+
166	-	-

Se observa que sólo el 50% de los resultados eran concordantes. En 3 cepas la RCP fue positiva y negativo el efecto vacuolizante, y en 1 aislamiento el efecto vacuolizante fue positivo y negativa la RCP.

**ABRIR 4.3 MÉTODOS...**

